



**Streptogramin B-Antibiotika und azide Lipopeptide:
Chemoenzymatische Derivatisierung der Makrozyklen
und Biosynthese nichtproteinogener Bausteine**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Christoph Mahlert
aus Rotenburg/Fulda

Marburg/Lahn 2007

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel von Februar 2004 bis August 2007 an der Philipps-Universität Marburg durchgeführt.

vom Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation

angenommen am: _____

Erstgutachter: Herr Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel

Zweitgutachter: Herr Prof. Dr. Lars-Oliver Essen

Tag der mündlichen Prüfung am: 6. Dezember 2007

Der Hauptteil dieser Arbeit wurde in folgenden Artikeln publiziert:

Stereospecific Enzymatic Transformation of α -Ketoglutarate to (2S,3R)-3-Methyl Glutamate during Acidic Lipopeptide Biosynthesis.

Mahlert, C., Kopp, F., Thirlway, J., Micklefield, J. and Marahiel, M.A. (2007) *J Am Chem Soc*, **129**, 12011-12018.

Chemoenzymatic approach to enantiopure streptogramin B variants: characterization of stereoselective pristinamycin I cyclase from *Streptomyces pristinaespiralis*.

Mahlert, C., Sieber, S.A., Grünewald, J. and Marahiel, M.A. (2005) *J Am Chem Soc*, **127**, 9571-9580.

Im Verlauf der Promotion wurden weiterhin folgende Artikel veröffentlicht:

Mechanistic and structural basis of stereospecific C β -hydroxylation in calcium-dependent antibiotic, a daptomycin-type lipopeptide.

Strieker, M., Kopp, F., Mahlert, C., Essen, L.O. and Marahiel, M.A. (2007) *ACS Chem Biol*, **2**, 187-196.

The iterative gramicidin S thioesterase catalyzes peptide ligation and cyclization.

Hoyer, K.M., Mahlert, C. and Marahiel, M.A. (2007) *Chem Biol*, **14**, 13-22.

Peptide macrocyclization: the reductase of the nostocyclopeptide synthetase triggers the self-assembly of a macrocyclic imine.

Kopp, F., Mahlert, C., Grünewald, J. and Marahiel, M.A. (2006) *J Am Chem Soc*, **128**, 16478-16479.

Chemoenzymatic design of acidic lipopeptide hybrids: new insights into the structure-activity relationship of daptomycin and A54145.

Kopp, F., Grünewald, J., Mahlert, C. and Marahiel, M.A. (2006) *Biochemistry*, **45**, 10474-10481.

Chemoenzymatic pathways towards novel peptide antibiotics.

Grünewald, J., Mahlert, C., Kopp, F. and Marahiel, M.A. (2006) *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, **5**, 227-243.

Fluorescence resonance energy transfer as a probe of peptide cyclization catalyzed by nonribosomal thioesterase domains.

Grünewald, J., Kopp, F., Mahlert, C., Linne, U., Sieber, S.A. and Marahiel, M.A. (2005) *Chem Biol*, **12**, 873-881.

Synthesis of linear gramicidin requires the cooperation of two independent reductases.

Schracke, N., Linne, U., Mahlert, C. and Marahiel, M.A. (2005) *Biochemistry*, **44**, 8507-8513.

Synthesis and derivatization of daptomycin: a chemoenzymatic route to acidic lipopeptide antibiotics.

Grünewald, J., Sieber, S.A., Mahlert, C., Linne, U. and Marahiel, M.A. (2004) *J Am Chem Soc*, **126**, 17025-17031.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation mit dem Titel „Streptogramin B-Antibiotika und azide Lipopeptide: Chemoenzymatische Derivatisierung der Makrozyklen und Biosynthese nichtproteinogener Bausteine“ selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort, Datum)

Christoph Mahlert

Für Anna

Zusammenfassung

Nichtribosomale Peptide zeichnen sich durch eine hohe strukturelle Diversität aus, die durch die Anwesenheit vieler nichtproteinogener Aminosäuren im Peptidrückgrat zustande kommt. Oft sind diese Bausteine wichtig oder sogar essentiell für die Bioaktivität der jeweiligen Naturstoffe. Die Bioaktivität wird weiterhin durch die konformationelle Rigidität des Peptidrückgrats gewährleistet, die häufig durch ihre makrozyklische Struktur gesichert wird. Die Makrozyklisierung wird während des letzten Schritts der nichtribosomalen Peptidsynthese durch sogenannte Thioesterase (TE)-Domänen katalysiert.

Die hier vorgestellte Arbeit beschäftigt sich sowohl mit der Entwicklung von chemoenzymatischen Strategien zur Synthese bzw. Modifizierung der Streptogramin B (S_B) – Antibiotika, als auch mit der Biosynthese des nichtproteinogenen 3-Methyl-Glutamat-Bausteins (3-MeGlu) der aziden Lipopeptide.

Der erste Teil dieser Arbeit beschreibt einen TE-basierenden chemoenzymatischen Ansatz zur schnellen und unkomplizierten S_B -Synthese, bei dem die strukturelle Diversität durch Standard-Peptidfestphasensynthese von linearen S_B -Analoge und die Stereoselektivität durch nachfolgende enzymatische Zyklisierung erreicht wird. Zu diesem Zweck wurde die rekombinante TE-Domäne SnbDE-TE der Pristinamycin I-Synthetase aus *Streptomyces pristinaespiralis* biochemisch charakterisiert. Diese Zyklase katalysiert die Makrolaktonisierung linearer Peptidylthioesteranaloga von Pristinamycin I mit hoher Regio- und Stereoselektivität. Eine stereoselektive Zyklisierung ausgehend von komplexen *in situ* razemisierenden Substratmischungen ermöglicht eine elegante S_B -Synthese über eine dynamische kinetische Resolution. Für die enzymatische Zyklisierung wurde eine beachtliche Substrattoleranz der SnbDE-Zyklase festgestellt, welche alle sieben Positionen des Peptidrückgrats einschließt. Eine *N*-Methylierung der Peptidbindung zwischen den Positionen 4 und 5 erhöht die Produktbildungsrate erheblich.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der biochemischen *in vitro*-Charakterisierung des Biosynthesewegs von 3-Methyl-Glutamat (3-MeGlu), einem für die biologische Aktivität der aziden Lipopeptide CDA, Daptomycin und A54145 wichtigen Baustein. Die Untersuchungen zeigen, dass GlmT aus *Streptomyces coelicolor*, DptI aus *Streptomyces roseosporus* und LptI aus *Streptomyces fradiae* *S*-Adenosyl-Methionin (SAM)-abhängige α -Ketoglutarat (α KG)-Methyltransferasen sind, welche die stereospezifische Methylierung von α KG zu (3*R*)-3-Methyl-2-Oxoglutarat katalysieren. Weiterhin wurde die verzweigt-kettige Aminosäure-Transaminase IlvE (SCO5523) aus *S. coelicolor* als ein effizientes Enzym für die nachfolgende Transaminierung zu (2*S*,3*R*)-3-MeGlu identifiziert. Die beobachtete stereospezifische Zwei-Schritt-Umsetzung von α KG zu (2*S*,3*R*)-3-MeGlu vervollständigt das Verständnis der Biosynthese und des Einbaus von C_β -methylierten Aminosäuren in nichtribosomale Peptide und erweitert unsere Kenntnis von Mechanismen zur Generierung von struktureller Diversität in Naturstoffen.

Abkürzungen und Fachbegriffe

3-MeGlu	3-Methyl-Glutamat	h-Asn	3-Hydroxy-Asparagin
A	Adenylierungsdomäne	HBA	3-Hydroxy-Benzoesäure
Abb.	Abbildung	HEPES	2-N'-[N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazinyl]-Ethansulfonsäure
Abu	2-Aminobuttersäure	HOBt	1-Hydroxybenzotriazol
Ac	Acetyl	HPA	3-Hydroxy-Picolinsäure
ACP	Acyl-Carrier-Protein	HPG	4-Hydroxy-Phenylglycin
ADP	Adenosin-5'-Diphosphat	IMAC	Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie
Aloc	Allyl-Oxycarbonyl	IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalacto-Pyranosid
AMP	Adenosin-5'-Monophosphat	Kan	Kanamycin
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat	Kyn	Kynurenin
BA	Benzoesäure	M	N-Methylierungsdomäne
Boc	Tert-Butyl-Oxycarbonyl	MALDI-TOF	Matrix-unterstützte Laserdesorption-Flugzeit
C	Kondensationsdomäne	MRSA	Methicillin-resistente <i>Staphylococcus aureus</i> -Stämme
CDA	Kalzium-abhängiges Antibiotikum	NRP	nichtribosomales Peptid
CDAPSI	CDA Peptidsynthetase III	NRPS	nichtribosomale Peptidsynthetase / nichtribosomale Peptidsynthese
CoA	Koenzym A	OD₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
COM-Domäne	Kommunikationsdomäne	PA	Picolinsäure
Cy	Zyklisierungsdomäne	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Da	Dalton	Papa	4-Amino-Phenylalanin
DCC	Dicyclohexylcarbodiimid	PCP	Peptidyl-Carrier-Protein
DCM	Dichlormethan	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
DIPEA	Diisopropylethylamin	PEGA	Polyethylen-Glykol-Amid
DMF	N,N-Dimethylformamid	Pic	Picolinsäure
Dmpapa	4-N,N-Dimethylamino-Phenylalanin	Pip	Pipecolinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid	PK	Polyketid
E	Epimerisierungsdomäne	PKS	Polyketidsynthase / Polyketidsynthese
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	PLP	Pyridoxal-5'-Phosphat
ESI-MS	Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie	PMP	Pyridoxamin-Phosphat
FDA	Food and Drug Administration	Ppan	4'-Phosphopantethein
Fen-TE	Fengycin-Thioesterase	PPi	Anorganisches Phosphat
FMN	Flavinmononukleotid	PPTase	4'-Phosphopantetheinyl-Transferase
Fmoc	9-Fluorenyl-Methyl-Oxycarbonyl	PyBOP	Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-Pyrrolidino-Phosphonium-Hexafluorophosphat
FPLC	Schnelle Flüssigchromatographie		
GlmT	Glutamat-Methyltransferase		

R	Reduktasedomäne		
RP-HPLC	Umkehrphasen-Hochleistungs- flüssigkeitschromatographie	TE II	Thioesterase des Typs II
rpm	Umdrehungen pro Minute	TFA	Trifluoressigsäure
S_A	Streptogramin A	TFE	Trifluorethanol
SAM	<i>S</i> -Adenosyl-Methionin	TIPS	Triisopropylsilan
S_B	Streptogramin B	t_R	Retentionszeit
SDS	Natriumdodecylsulfat	Tris	Tris-(Hydroxymethyl)- Aminomethan
SIM	Single Ion Mode	Tyc-TE	Tyrocidin-Thioesterase
SNAC	<i>N</i> -Acetyl-Cysteamin	v/v	Volumen/Volumen
SPPS	Peptid-Festphasensynthese	VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
Tab.	Tabelle	w/v	Masse/Volumen
tBu	Tert-Butyl	αKG	α-Ketoglutarat

Proteinogene Aminosäuren : Abkürzungen und relative Molmasse

Aminosäure	3-Buchstabencode	1-Buchstabencode	M _r [g/mol]
Alanin	Ala	A	89
Arginin	Arg	R	174
Asparagin	Asn	N	132
Aspartat	Asp	D	133
Cystein	Cys	C	121
Glutamin	Glu	Q	146
Glycin	Gly	G	75
Histidin	His	H	155
Isoleucin	Ile	I	131
Leucin	Leu	L	131
Lysin	Lys	K	146
Methionin	Met	M	149
Ornithin	Orn	O	132
Phenylalanin	Phe	F	165
Prolin	Pro	P	115
Serin	Ser	S	105
Threonin	Thr	T	119
Tryptophan	Trp	W	204
Tyrosin	Tyr	Y	181
Valin	Val	V	117

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	V
ABKÜRZUNGEN UND FACHBEGRIFFE	VI
INHALTSVERZEICHNIS	VIII
1 <i>EINLEITUNG</i>	1
1.1 Nichtribosomale Peptide: Diversität und Rigidität	2
1.2 Nichtribosomale Peptidsynthese	4
1.2.1 Die essentiellen Domänen	5
1.2.2 Die optionalen Domänen	7
1.2.2.1 Die Epimerisierungsdomäne	8
1.2.2.2 Die <i>N</i> -Methylierungsdomäne	9
1.2.2.3 Weitere optionale Domänen	10
1.3 Die Stoffklasse der Streptogramin-Antibiotika	10
1.3.1 Der Wirkungsmechanismus der Streptogramine	12
1.3.2 Strukturelle Analyse des Wirkungsmechanismus	13
1.3.3 Biosynthese der Streptogramin B-Antibiotika	14
1.4 Die Antibiotikaklasse der aziden Lipopeptide	16
1.4.1 Biosynthese der aziden Lipopeptide	18
1.4.2 Eigenschaften und Biosynthese des 3-MeGlu-Restes	19
1.5 Peptidzyklisierung durch Thioesterasedomänen	20
1.5.1 Mechanismus der Peptidzyklisierung	21
1.5.2 <i>In vitro</i> -Zyklisierungsaktivität rekombinanter TE-Domänen	23
1.5.3 Chemoenzymatische Ansätze zur Synthese neuer Zyklopeptide	25
1.6 Fragestellung dieser Arbeit	28
2 <i>MATERIAL</i>	29
2.1 Geräte	29
2.2 Chemikalien, Enzyme, Laborprodukte	30
2.3 Vektoren	31
2.3.1 pBAD202/D-TOPO	31
2.3.2 pCB28(a+)	32
2.3.3 pQTEV	32
2.4 Mikroorganismen	33
2.4.1 <i>Escherichia coli</i> XL1-Blue	33
2.4.2 <i>Escherichia coli</i> Top 10	33
2.4.3 <i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)	33
2.5 Medien	33

3	METHODEN	34
3.1	Molekularbiologische Methoden	34
3.1.1	Konstruktion der rekombinanten Plasmide	34
3.1.2	DNA-Sequenzierung	36
3.2	Proteinchemische Methoden	36
3.2.1	Genexpression	36
3.2.1.1	Expression unter Verwendung des pBAD202/D-TOPO-Vektors	37
3.2.1.2	Expression unter Verwendung des pQTEV-Vektors	37
3.2.1.3	Expression unter Verwendung des pCB28(a+)-Vektors	37
3.2.2	Proteinreinigung	38
3.2.2.1	Zellaufschluss	38
3.2.2.2	Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie	38
3.2.2.3	Bestimmung der Proteinkonzentration	39
3.3	Biochemische Methoden	40
3.3.1	SnbDE-TE-vermittelte Peptidzyklisierung	40
3.3.2	Genereller GlmT-, DptI- und LptI-vermittelter Methylierungsassay	42
3.3.3	Methylierungsassay mit Glu-S-PCP	42
3.3.4	Methylierungsassay mit einem CDA-Analogon	42
3.3.5	Methylierungsassay mit freien α -Ketosäuren oder Aminosäuren	42
3.3.6	Transaminierungsassay mit kommerziellen Transaminasen	43
3.3.7	Transaminierungsassay mit IlvE aus <i>Streptomyces coelicolor</i>	44
3.3.8	Gekoppelter Methylierungs-Transaminierungs-Assay	44
3.3.9	Konfigurationsanalyse des enzymatisch synthetisierten 3-MeGlu	45
3.4	Festphasen-Peptidsynthese (SPPS)	45
3.4.1	Die Initiation der Peptidsynthese	46
3.4.2	Elongation der Peptidketten	47
3.4.3	Die Termination der Peptidsynthese: Die Abspaltung vom Harz	48
3.5	Organische Synthese	49
3.5.1	Peptidsynthese	49
3.5.2	Synthese von Peptidyl-SNAC-Substraten	49
3.5.3	Synthese von Fmoc-N-Methyl-4-(Dimethylamino)-L-Phenylalanin	50
3.6	Analytische Methoden	50
3.6.1	¹ H-NMR-Spektrometrie	50
3.6.2	Massenspektrometrie	51
4	ERGEBNISSE	52
4.1	Chemoenzymatische Synthese von Streptogramin B-Derivaten	52
4.1.1	Expression der SnbDE-Zyklase als Thioredoxin-Fusionsprotein	53
4.1.2	Peptidzyklisierung synthetischer Peptidylthioester-Substrate	53
4.1.3	Regioselektivität der SnbDE-Zyklase	55
4.1.4	Stereoselektivität der SnbDE-Zyklase	56
4.1.5	Zyklisierung razemisierungsempfindlicher Substratanaloga	58
4.1.6	Enzymatische Öffnung des Makrolaktons – Beweis der einheitlichen Stereochemie des Makrozyklus	60
4.1.7	Zeitaufgelöste Umsetzung der Phg ₇ -PLP-SNAC-Epimerenmischung	61
4.1.8	Phg ₇ -enthaltende Substrate: Dynamische Kinetische Resolution	62
4.1.9	Substratspezifität der SnbDE-Zyklase	63
4.1.9.1	Der Alanin-Scan	63
4.1.9.2	Der Einfluss von Position 1 auf die Zyklisierung	64
4.1.9.3	Variation der Ringgröße der enzymatisch gebildeten Makrolaktone	65
4.1.9.4	Variationen des Zyklisierungsnukleophils	65
4.1.9.5	Kinetische Analyse der Substratspezifität	66
4.1.9.6	Der Einfluss der N-Methylierungen an Position 5	68
4.1.10	Zusammenfassung der Charakterisierung der SnbDE-Zyklase	70

4.2	Biosynthese des (2S,3R)-3-Methyl-Glutamat-Restes der aziden Lipopeptide	72
4.2.1	Expression der Methyltransferasen GlmT, DptI und LptI	73
4.2.2	Expression von CDAPSI-PCP10	73
4.2.3	GlmT methyliert weder Glutamat, PCP-gebundenes Glutamat, noch CDA	74
4.2.4	GlmT, DptI und LptI methylieren α -Ketoglutarat	76
4.2.5	GlmT, DptI und LptI zeigen eine hohe Substratspezifität	77
4.2.6	Transaminierung von 3-Methyl-2-Oxoglutarat	78
4.2.6.1	Expression der Aminotransferase IlvE aus <i>Streptomyces coelicolor</i>	79
4.2.6.2	Transaminierung von synthetischem 3-Methyl-2-Oxoglutarat durch IlvE aus <i>S. coelicolor</i>	79
4.2.6.3	Gekoppelter Methylierungs-Transaminierungs-Assay	80
4.2.6.4	Stereospezifität der gekoppelten enzymatischen Reaktion	82
5	DISKUSSION	84
5.1	Die Enzymologie der SnbDE-Zyklase	84
5.1.1	Die Stereoselektivität der SnbDE-TE	85
5.1.2	Die Regioselektivität der SnbDE-TE	85
5.1.3	Veränderungen des Zyklisierungsnukleophils	86
5.1.4	Bildung von Zyklen verschiedener Ringgröße	87
5.1.5	Einfluss der N-methylierten Peptidbindung	87
5.1.6	Substrattoleranz der SnbDE-TE	88
5.2	Die SnbDE-Zyklase als Werkzeug zur Synthese von Streptogramin B-Derivaten	90
5.2.1	Synthetische Herausforderungen bei der Streptogramin B-Synthese	90
5.2.2	Dynamische Kinetische Resolution als Vereinfachung der Streptogramin B-Synthese	91
5.2.3	Design von verbesserten Streptogramin B-Varianten	94
5.2.3.1	Umgehung von Resistenzen gegen Streptogramin B-Antibiotika	94
5.2.3.2	Derivatisierung von S _B -Derivaten über Click-Chemie	98
5.3	Biosynthese des 3-MeGlu-Restes der aziden Lipopeptide	99
5.3.1	SAM-abhängige Methyltransferasen	100
5.3.2	Die Methylierung der aziden Lipopeptide geschieht vor dem Aufbau des Peptidrückgrats	103
5.3.3	GlmT, DptI und LptI sind SAM-abhängige α -Ketoglutarat-Methyltransferasen	104
5.3.3.1	Die C-Methylierung verläuft über resonanzstabilisierte Carbanionen	104
5.3.4	Transaminierung von 3-Methyl-2-Oxoglutarat zu 3-Methyl-Glutamat	108
5.3.4.1	Katalytischer Mechanismus von Aminotransferasen	109
5.3.4.2	Die verzweigt-kettige Aminosäure-Transaminase IlvE	110
5.3.4.3	Kinetische Charakterisierung der IlvE-katalysierten Transaminierung von 3-Methyl-2-Oxoglutarat	112
5.3.5	Stereospezifität der Methylierungs- und Transaminierungsreaktion	112
5.3.6	Weitere C-Funktionalisierungen	113
5.3.7	Schlussfolgerungen und Ausblick	117
6	LITERATUR	119
7	ANHANG	130
7.1	Biosynthesegencluster der aziden Lipopeptide	130
7.2	Biosynthese weiterer Aminosäuren der aziden Lipopeptide	131
7.3	Sequenzen der zur Konstruktion der Expressionsplasmide verwendeten PCR-Amplifikate	132

1 Einleitung

Zu Beginn der fünfziger Jahre wurden die ersten Antibiotika-resistenten Bakterienstämme identifiziert. Diese Resistenzen betrafen zunächst nur das Penicillin, mit dessen Entdeckung durch Alexander Fleming (1928) (Fleming, 1929) die beeindruckende Geschichte der modernen Antibiotikaforschung begann. Mit der Zeit wurden aber auch vermehrt Resistenzen gegen weitere Antibiotikaklassen mit pharmakologischer Bedeutung beobachtet. Der breite sorglose Einsatz von Antibiotika sowohl in der Tiermast als auch zur Behandlung von eher harmlosen Krankheiten führte zur Selektion und Vermehrung resistenter Bakterien. Mittlerweile sehen wir uns besonders in Kliniken mit multiresistenten Erregern konfrontiert, die sich durch Mutationen oder durch Aufnahme resistenzvermittelnder Fremd-DNA gebildet haben (Walsh, 2000). Vor allem bei Gram-positiven Organismen, insbesondere *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* und den Enterokokken wurde in den letzten Jahren eine zunehmende Multiresistenz beobachtet. (Chambers, 1997). In den neunziger Jahren war das Glykopeptid-Antibiotikum Vancomycin oft das letzte Verteidigungsmittel gegen diese Stämme. Allerdings treten auch gegen dieses hochwirksame Antibiotikum zunehmend Resistenzen auf (Hoeffler und Zimmermann, 1997).

Die einzige Möglichkeit, diesem Problem zu begegnen, ist die ständige Verbesserung oder Neuentwicklung von Antibiotika. Als ergiebige Quelle für die Neuentdeckung bioaktiver Verbindungen haben sich Produkte des Sekundärmetabolismus von Mikroorganismen erwiesen (Challis und Hopwood, 2003). Durch Untersuchungen von mikrobiellen Extrakten wurde eine große Anzahl neuer Verbindungen mit antibakteriellen, antiviralen, immunsuppressiven und Antitumor-Aktivitäten entdeckt (Schwarzer et al., 2003). Diese Sekundärmetabolite, die durch die Evolution über lange Zeiträume hinweg für ihre spezielle Funktion maßgeschneidert wurden, sind äußerst vielversprechende Grundgerüste für die Entwicklung neuer Medikamente mit verbesserten oder veränderten Eigenschaften. Die Optimierung kann durch künstliche Modifikationen der Grundstruktur oder durch Totalsynthese von neuen Naturstoff-basierten Produkten geschehen (Walsh, 2000; Wohlleben und Pelzer, 2002). Eine große Naturstoff-Unterklasse mit einer ungewöhnlich hohen strukturellen Diversität besteht aus peptidischen Produkten. Viele dieser Verbindungen zeigen therapeutisch nützliche Aktivitäten. Neben ribosomal synthetisierten Peptiden, zum Beispiel den Lantibiotika (Chatterjee et al., 2005), wird der weitaus größere Anteil dieser Verbindungen durch große Multienzymkomplexe, die sogenannten nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS), hergestellt (Marahiel et al., 1997; Sieber und Marahiel, 2005). Die

von diesen Synthetasen hergestellten Peptide enthalten nicht nur die 20 proteinogenen Aminosäuren, sondern hunderte von verschiedenen Bausteinen, wodurch ihre hohe strukturelle Diversität entsteht (Sieber und Marahiel, 2005; Walsh et al., 2001). Bei einer weiteren großen Gruppe von bioaktiven Sekundärmetaboliten handelt es sich um Polyketide, die durch sogenannte Polyketidsynthasen (PKS) hergestellt werden. Der modulare Aufbau der NRPSs und PKSs, auf den in dieser Einleitung noch genauer eingegangen wird (Abschnitt 1.2), ermöglicht durch unterschiedlichste Modulkombinationen die große Vielfalt von Sekundärmetaboliten, die auch aus Hybriden von nichtribosomalen Peptiden (NRP) und Polyketiden (PK) bestehen können (Walsh, 2004). Durch die moderne biochemische Forschung konnte ein detailliertes Wissen über den Mechanismus der nichtribosomalen Peptidsynthese gewonnen werden, und durch einen neuen chemoenzymatischen Ansatz, der Peptidsynthese und Enzymkatalyse kombiniert, konnte die Struktur natürlicher nichtribosomaler Peptide in vielen Fällen gezielt verändert werden. Die Vorstellung dieser Methode ist ebenfalls Thema dieser Einleitung (Abschnitt 1.5). Einen weiteren Schwerpunkt stellt ein kurzer Überblick über die strukturelle Diversität nichtribosomaler Peptide dar. Diese spiegelt sich besonders eindrucksvoll in den Strukturen der Streptogramin B (S_B)-Antibiotika und der aziden Lipopeptide wieder, welches beide Antibiotikaklassen von höchster pharmakologischer Bedeutung sind. Da die Arbeit an der chemoenzymatischen Synthese von S_B-Varianten und an der mechanistischen Aufklärung einer bedeutsamen Aminosäuremodifizierung während der Biosynthese der aziden Lipopeptide das Thema dieser Studie ist, wird in der Einleitung auch auf diese beiden Naturstoffklassen detailliert eingegangen (Abschnitte 1.3 und 1.4).

1.1 Nichtribosomale Peptide: Diversität und Rigidität

Die Strukturen nichtribosomaler Peptide weisen eine erstaunliche Vielfalt auf, die nicht allein durch das breitangelegte Spektrum von verwendeten Bausteinen erklärt werden kann. Zusätzlich zur Verwendung von ungewöhnlichen Monomeren wird in der Sekundärmetabolitsynthese durch die koordinierte Aktivität von sogenannten Tailoring-Enzymen die bereits vorhandene strukturelle Vielfalt noch einmal deutlich erhöht (Walsh et al., 2001). Durch Rigidifizierung der Konformation oder durch Anfügen bestimmter Bausteine oder funktioneller Gruppen bewirken diese Modifikationen eine Feinabstimmung der Bioaktivität der Naturstoffe, und sind oft sogar von essentieller Bedeutung für die biologische Wirksamkeit.

Abbildung 1.1 zeigt einige ausgewählte Strukturen von nichtribosomalen Peptiden, die diese strukturelle Diversität veranschaulichen sollen. Einige der erwähnten Tailoringschritte geschehen durch in die NRPSs integrierte Domänen, was später noch genauer beschrieben wird. Dazu gehören *N*-Methylierungen der Peptidbindungen wie im Phytotoxin Enniatin (Haese et al., 1993) oder im Immunsuppressivum Cyclosporin (**1**) (Weber et al., 1994), Epimerisierungen von Aminosäuren am C α -Atom (Stachelhaus und Walsh, 2000) wie im Antibiotikum Pristinamycin I (**2**) (de Crecy-Lagard et al., 1997a), und Heterozyklisierungen, wie die im Eisen-chelatisierenden Siderophor Vibriobactin (**3**) vorhandenen Oxazolinringe (Wyckoff et al., 1997) oder die im potenten Telomeraseinhibitor Telomestatin (**4**) vorhandenen Oxazolringe (Walsh, 2004). Die genannten Heterozyklisierungen haben einen deutlichen Einfluss auf die Konformation der Naturstoffe. Zusätzlich zu dieser Strategie gibt es noch einen weiteren bemerkenswerten Weg, um die Konformation zu beeinflussen: Die Glykopeptidantibiotika der Vancomycin- (**5**) und Teicoplanin-Klasse (Kahne et al., 2005) bestehen aus einem Heptapeptidgerüst, dessen Rückgrat durch oxidative Quervernetzung von phenolischen Seitenketten in seiner Konformation stark eingeschränkt wird. Die Verbindung von elektronenreichen aromatischen Ringen durch Arylether-Brücken oder direkte C-C-Kupplungen überführt diese beweglichen Heptapeptide in rigide kelchförmige Strukturen, die essentiell für ihre Bioaktivität sind (Barna und Williams, 1984; Williams, 1983). Allgemein wird die Konformation vieler nichtribosomaler Peptide durch ihre makrozyklische Struktur stabilisiert. Diese Stabilisierung ist essentiell für die Bioaktivität der Peptide (Kohli und Walsh, 2003; Kopp und Marahiel, 2007)

Außer den oben genannten *N*-Methylierungen sind auch *C*-Methylierungen von nichtribosomalen Peptiden, zum Beispiel im Antibiotikum Daptomycin (**6**) (Nguyen et al., 2006) und im Mannozeptimycin (**7**) (Magarvey et al., 2006), und von PK-NRP-Hybriden, zum Beispiel im Aminocoumerin-Antibiotikum Coumermycin (Pacholec et al., 2005), bekannt. Eine weitere strukturelle Besonderheit ist das Auftreten von C β -hydroxylierten Aminosäuren wie z.B. im Antibiotikum Mannozeptimycin (**7**) (Haltli et al., 2005) oder C β -phosphorylierten Bausteinen wie im CDA (**8**) (Neary et al., 2007; Strieker et al., 2007). Zuletzt sollen in dieser Übersicht noch Chlorierungen und Glykosylierungen von nichtribosomalen Peptiden erwähnt werden. Diese beiden Modifikationen finden sich beispielsweise im bereits erwähnten Glykopeptidantibiotikum Vancomycin (**5**). Ein Beispiel für ein an einem aliphatischen C-Atom chloriertes Peptid ist das Syringomycin E (**8**) (Vaillancourt et al., 2005), welches zusätzlich auch noch eine C β -Hydroxylierung aufweist.

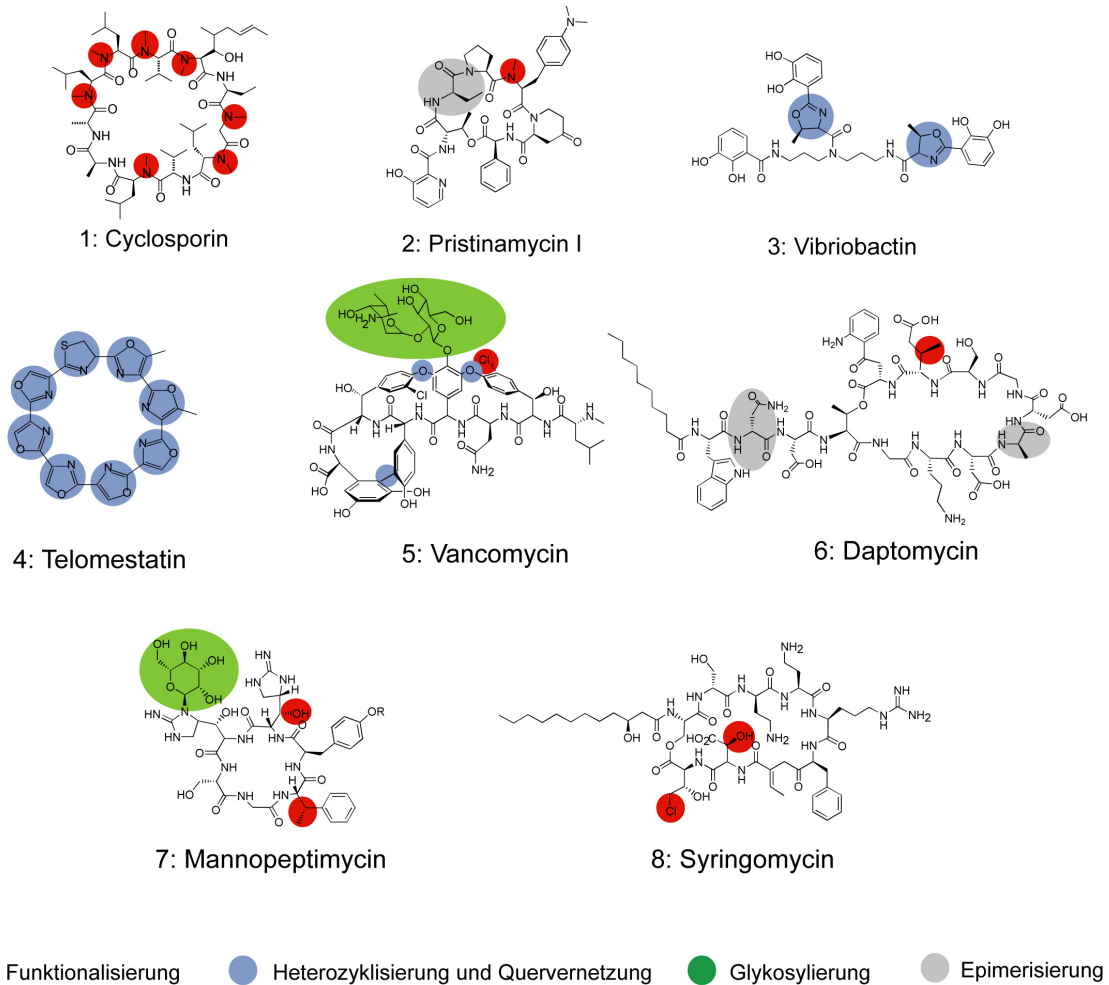


Abbildung 1.1: Darstellung der Diversität von nichtribosomalen Peptiden an ausgewählten Beispielen.

Strukturelle Modifikationen, die zu Rigidität und Diversität beitragen, sind farblich hervorgehoben. Nur ausgewählte D-Aminosäuren sind grau unterlegt.

1.2 Nichtribosomale Peptidsynthese

In diesem Abschnitt sollen die Grundprinzipien der nichtribosomalen Peptidsynthese vorgestellt werden. NRPSs bestehen aus modular organisierten Multienzymen von beachtlicher Größe (Lipmann, 1980; Lipmann, 1971; Marahiel et al., 1997): Die Cyclosporin A-Synthetase z.B. hat eine Größe von 1.6 MDa und ist damit die größte natürliche bekannte Polypeptidkette (Weber et al., 1994). Der modulare Aufbau der jeweiligen NRPS spiegelt die Struktur des von ihr synthetisierten Produkts wieder: Da jedes einzelne Modul einer NRPS für den Einbau einer bestimmten Aminosäure ins Endprodukt zuständig ist (Marahiel et al., 1997), entspricht die Modulanzahl der NRPS normalerweise der Anzahl der Aminosäuren des zugehörigen Peptids. Außerdem entspricht die Anordnung der Module der Primärsequenz des Peptids, da die nichtribosomale Peptidsynthese in der Regel kolinear vom N- zum

C-Terminus erfolgt. Von dieser Kolinearität gibt es jedoch auch Ausnahmen: Sogenannte iterative NRPSs verwenden ihre Module während der Peptidsynthese mehrfach, während bei nichtlinearen NRPSs kein Zusammenhang zwischen der Modulabfolge und der Sequenz des Peptidprodukts erkennbar ist (Mootz et al., 2002).

Die einzelnen NRPS-Module lassen sich weiter in sogenannte Domänen unterteilen. Diese Domänen katalysieren die einzelnen Reaktionsschritte der Peptidsynthese. Die Funktionen der einzelnen Domänen werden in den folgenden Abschnitten vorgestellt.

1.2.1 Die essentiellen Domänen

Für die nichtribosomale Peptidsynthese werden drei sogenannte essentielle Domänen benötigt: Die Adenylierungsdomäne (A-Domäne), das Peptidyl-Carrier-Protein (PCP) und die Kondensationsdomäne (C-Domäne). Einen Überblick über die von diesen Domänen katalysierten Reaktionen, die im Folgenden beschrieben sind, gibt Abbildung 1.2.

Die A-Domäne (ca. 550 Aminosäuren) kontrolliert den Substrateintritt in die Synthese, in dem sie eine bestimmte Aminosäure spezifisch erkennt und unter ATP-Hydrolyse als Aminoacyladenylat-Intermediat aktiviert (Conti et al., 1997; May et al., 2002). Die A-Domäne überträgt die aktivierte Aminosäure im zweiten Schritt auf die Thiolgruppe des 4'-Phosphopantethein-Kofaktors des moduleigenen PCPs (Abb. 1.2, Schritt 2).

Das PCP (ca. 80 Aminosäuren) ermöglicht den geordneten Transport von Substraten und Elongationsintermediaten zu den katalytischen Zentren von anderen Domänen. Die Reaktionsintermediate bleiben während der gesamten Synthese kovalent an die 20 Å langen 4'-Phosphopantethein (ppan)-Kofaktoren der PCPs gebunden (Ehmann et al., 2000; Stachelhaus et al., 1996). Diese Strategie ermöglicht eine Kanalisierung des Substratflusses, wodurch die durch Diffusion hervorgerufenen Beschränkungen der katalytischen Effizienz aufgehoben werden (Sieber und Marahiel, 2005). Die ppan-Kofaktoren werden in einem als „priming“ bezeichneten Prozess posttranslational von Koenzym A (CoA) auf einen konservierten Serinrest der PCPs übertragen, wodurch sie von der apo- in die holo-Form überführt werden (Abb. 1.2, Schritt 1a). Diese Reaktion wird durch 4'-Phosphopantetheinyl-Transferasen (PPTasen) katalysiert (Lambalot et al., 1996). Eine gut charakterisierte PPTase des Sekundärmetabolismus ist Sfp aus *Bacillus subtilis* (Quadri et al., 1998). Diese PPTase weist eine geringe Substratspezifität auf und akzeptiert auch verschiedenste funktionalisierte CoA-Derivate, was z.B. ausgenutzt wurde, um Proteine mit fluoreszierenden Reportergruppen zu markieren oder PCP-getagte Proteine aus komplexen Proteinmischungen selektiv zu immobilisieren (La Clair et al., 2004; Yin et al., 2004). Wegen ihrer niedrigen

Substratspezifität akzeptieren die PPTasen *in vivo* auch Acyl-CoA-Derivate anstelle von CoA, wodurch fehlacylierte PCPs entstehen, die zu einer Blockierung der nichtribosomalen Peptidsynthese führen würden, da nachfolgende Domänen diese Acyl-PCPs nicht als Substrat erkennen würden. Um dies zu verhindern, werden solche Acylgruppen durch alleinstehende Thioesterasen des Typs II (TE II) durch hydrolytische Thioesterspaltung entfernt (Abb. 1.2, Schritte 1b und 1c) (Schwarzer et al., 2002). Diese Enzyme sind wahrscheinlich auch für ein sogenanntes „proofreading“, nämlich die Entfernung von fälschlicherweise auf die NRPS geladenen Aminosäuren zuständig (Yeh et al., 2004a).

Die eigentliche Peptidbindungsbildung wird in der nichtribosomalen Peptidsynthese durch die Kondensationsdomäne (C-Domäne) (ca. 450 Aminosäuren) katalysiert (Bergendahl et al., 2002; Stachelhaus et al., 1998). Nach Aktivierung und kovalenter Bindung der ersten Aminosäure an das holo-PCP des Initiationsmoduls (A-PCP) erfolgt die Peptidsynthese durch schrittweise Kondensation mit an die PCPs von *downstream* gelegenen Elongationsmodulen (C-A-PCP)_n gebundenen Aminosäuren. Die C-Domänen katalysieren dabei jeweils den nukleophilen Angriff der freien α -Aminogruppe der *downstream* gelegenen PCP-gebundenen Aminosäure auf die Thioesterbindung des *upstream* gelegenen PCP-gebundenen Aminoacyl- bzw. Peptidyl-Intermediats (Abb. 1.2, Schritte 3 und 4). Dieser Prozess wird durch in der C-Domäne vorhandene Donor- und Akzeptor-Stellen mit jeweiliger Spezifität für das Elektrophil und das Nukleophil gesteuert (Mootz et al., 2002). Diese Selektivitäten betreffen sowohl die Identität als auch die Stereochemie des jeweiligen Substrats (Belshaw et al., 1999; Clugston et al., 2003). Diese Ergebnisse zeigen, dass neben den A-Domänen auch die C-Domänen einen deutlichen Einfluss auf die Selektivität der nichtribosomalen Peptidsynthese haben. Kristallstrukturanalysen der freistehenden C-Domäne VibH (Keating et al., 2002), einem Enzym, das an der Biosynthese des Siderophors Vibriobactin in *Vibrio cholerae* beteiligt ist, und der PCP-C-Domäne der Module 5 und 6 der Tyrocidin-Synthetase TycC aus *Bacillus brevis* (Samel et al., 2007) gaben erste Einsichten in den Mechanismus der C-Domänen.

Das letzte Modul einer NRPS, das sogenannte Terminationsmodul, enthält gewöhnlich eine zusätzliche Domäne, die für die Abspaltung des Peptids von der Synthetase verantwortlich ist. Diese Abspaltung geschieht in den meisten Fällen unter Makrozyklisierung durch den intramolekularen Angriff eines Nukleophils des am PCP des Terminationsmoduls gebundenen PeptidylRestes auf die C-terminale Thioesterfunktion. Diese Makrozyklisierung wird durch sogenannte Thioesterase-Domänen (TE-Domänen) katalysiert (Grünewald und Marahiel, 2006), die auch als Zyklasen bezeichnet werden (Abb. 1.2, Schritt 5). Auf diese Domänen

wird später ausführlicher eingegangen (Abschnitt 1.5). Weitere Terminationsstrategien (Kopp und Marahiel, 2007) verwenden eine hydrolytische Spaltung des Peptidylthioesters, wie zum Beispiel bei der Vancomycin-Synthese (Kahne et al., 2005), oder eine reduktive Spaltung, wie zum Beispiel beim linearen Gramacidin (Schracke et al., 2005) oder beim Nostocyclopeptid (Kopp et al., 2006b).

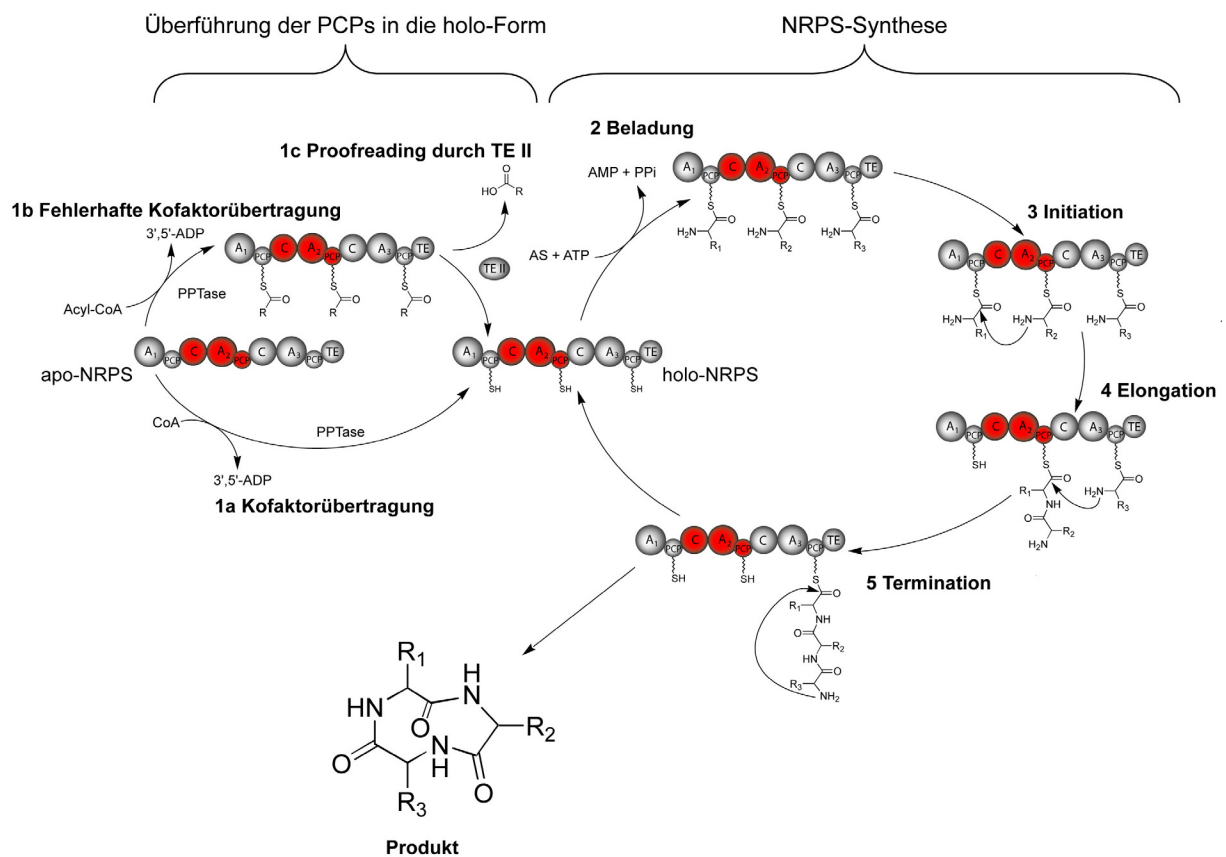


Abbildung 1.2: Apo-zu-holo-Konversion und Funktionsprinzip der nichtribosomalen Peptidsynthetasen (nach Schwarzer et al., 2003).

1.2.2 Die optionalen Domänen

Neben den im letzten Abschnitt vorgestellten essentiellen Domänen wurden noch eine Reihe weiterer Domänen in unterschiedlichen NRPS-Systemen identifiziert, die zwar nicht essentiell für die Peptidelongation sind, aber wesentlich zur Strukturvielfalt nichtribosomal synthetisierter Peptide beitragen. Auf die Funktion dieser optionalen Domänen soll in diesem Abschnitt genauer eingegangen werden.

1.2.2.1 Die Epimerisierungsdomäne

Ein wichtiges Merkmal vieler nichtribosomaler Peptide ist das Vorhandensein von D-Aminosäurebausteinen in ihrem Peptidrückgrat, die sowohl den proteolytischen Abbau der Peptide verhindern als auch wichtigen Einfluss auf die bioaktive Konformation des Peptids haben können (Konz und Marahiel, 1999). In den meisten Fällen geschieht der Einbau von D-Aminosäuren in die Peptide durch ein Zusammenspiel von in die NRPSs integrierten Epimerisierungsdomänen (E-Domänen) (ca. 450 AS) (Luo et al., 2002; Stachelhaus und Walsh, 2000) und die Selektivität der *downstream* gelegenen C-Domäne (Belshaw et al., 1999) (Abb. 1.3).

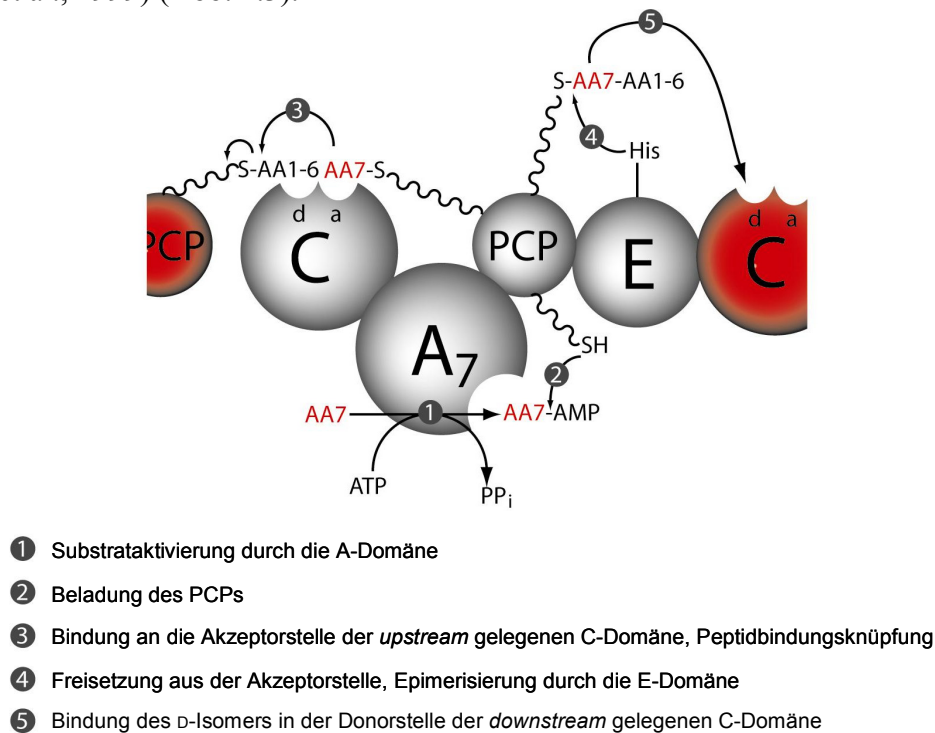


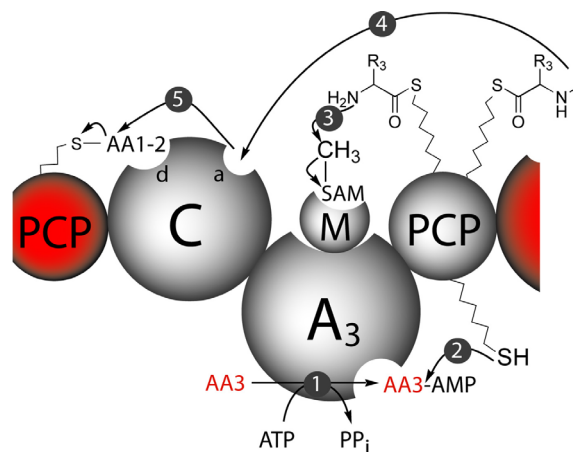
Abbildung 1.3: Einbau von D-Aminosäuren in nichtribosomale Peptide durch das Zusammenspiel von E-Domäne und *downstream* gelegener C-Domäne (nach Sieber und Marahiel, 2005).

AA: Aminosäure; d: Donorstelle; a: Akzeptorstelle

Die E-Domäne katalysiert die C-terminale Epimerisierung von PCP-gebundenen wachsenden Peptidketten bzw. die Razemisierung von PCP-gebundenen Aminosäuren. Die angrenzende *downstream* gelegene C-Domäne weist in ihrer Donorstelle eine D-spezifische Stereoselektivität für das PCP-gebundene Elektrophil auf, wodurch ein selektiver Einbau der D-Aminosäure in das Peptid gewährleistet wird. Häufig sind E-Domänen am C-terminalen Ende einer Synthetase zu finden und an der spezifischen Erkennung der Synthetasen untereinander über kleine helikale kommunikationsvermittelnde Einheiten (COM-Domänen) beteiligt (Hahn und Stachelhaus, 2004; Stein et al., 2006).

1.2.2.2 Die *N*-Methylierungsdomäne

Viele nichtribosomale Peptide enthalten *N*-methylierte Peptidbindungen, wie z.B. das Cyclosporin (Velkov und Lawen, 2003), das Pristinamycin (de Crecy-Lagard et al., 1997b), das Actinomycin (Schauwecker et al., 2000) oder das Enniatin (Haese et al., 1993). Diese *N*-Methylierungen werden meist durch in die C-terminalen Enden von A-Domänen insertierte sogenannte *N*-Methylierungsdomänen (M-Domäne) (ca. 420 Aminosäuren) katalysiert. Die M-Domänen nutzen *S*-Adenosyl-Methionin (SAM) als Kosubstrat. Sie katalysieren den nukleophilen Angriff der α -Aminogruppe der PCP-gebundenen Aminosäure auf die aktivierte Methylgruppe des Kosubstrats SAM (Abb. 1.4).



- ① Substrataktivierung durch die A-Domäne
- ② Beladung des PCPs
- ③ Methylierung der PCP-gebundenen Aminosäure durch die M-Domäne
- ④ Bindung an die Akzeptorstelle der *upstream* gelegenen C-Domäne
- ⑤ Peptidbindungsknüpfung durch die *upstream* gelegene C-Domäne

Abbildung 1.4: Einbau von *N*-methylierten Aminosäuren in nichtribosomale Peptide durch das Zusammenspiel von M-Domäne und *upstream* gelegener C-Domäne.

AA: Aminosäure; SAM: *S*-Adenosyl-Methionin; d: Donorstelle; a: Akzeptorstelle

Biochemische Analysen von M-Domänen aus unterschiedlichen Systemen zeigten, dass die PCP-gebundene Aminosäure das Methylierungssubstrat ist, und dass die *N*-Methylierung vor der Peptidbindungsbildung geschieht (Schauwecker et al., 2000; Weckwerth et al., 2000; Zocher et al., 1983; Zocher et al., 1986).

1.2.2.3 Weitere optionale Domänen

Weitere optionale Domänen, auf die hier weniger detailliert eingegangen werden soll, sind die Zyklisierungs-(Cy)-Domäne und die Oxidations-(Ox)-domäne. Die Cy-Domäne ersetzt in einigen Cys-, Ser- und Thr-spezifischen Modulen die C-Domäne. Zusätzlich zur Peptidbindungsbildung katalysiert sie eine Zyklodehydratisierung der Peptidbindung, was zur Bildung von fünfgliedrigen Heterozyklen (Oxazoline aus Thr und Ser, Thiazoline aus Cys) führt (Konz und Marahiel, 1999; Marahiel et al., 1997; Sieber und Marahiel, 2005). Oft wird das Vorhandensein einer Cy-Domäne von der Anwesenheit einer Oxidationsdomäne (Ox-Domäne) (ca. 250 Aminosäuren) begleitet. Diese Domäne katalysiert die Flavinmononukleotid (FMN)-abhängige Oxidation von Oxazolin- und Thiazolinringen zu den stabileren Oxazol- und Thiazolringen (Du et al., 2000; Schneider und Walsh, 2004) (siehe Abschnitt 1.1).

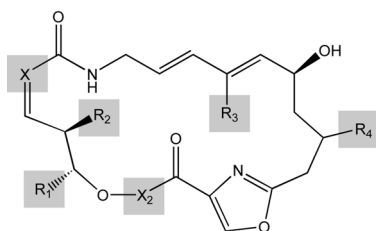
1.3 Die Stoffklasse der Streptogramin-Antibiotika

Da sich ein Großteil dieser Arbeit mit der chemoenzymatischen Synthese von Streptogramin B (S_B)-Antibiotika beschäftigt, soll im Folgenden ein Überblick über die Antibiotikaklasse der Streptogramine gegeben werden.

Die Streptogramin-Antibiotika weisen eine hohe strukturelle Komplexität auf und werden von einer großen Anzahl unterschiedlicher Bakteriengattungen synthetisiert: von Streptomyceten, Actinoplaneten, Actinomadura und Micromonospora (Barriere et al., 1998b). In allen Fällen werden die Streptogramine als 70:30-Kombination von zwei strukturell unabhängigen Verbindungen isoliert, die als Streptogramin A (S_A)- und Streptogramin B (S_B)- Untergruppe bezeichnet werden (Pechere, 1996). Jeder bakterielle Produzentstamm stellt mehrere strukturell unterschiedliche Moleküle beider Untergruppen her, wodurch in dieser Antibiotikaklasse eine extrem hohe Diversität entsteht (Abb. 1.5).

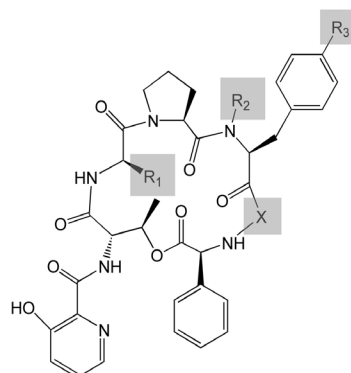
Eine spezielle Eigenschaft der Streptogramin-Antibiotika ist die synergistische Wirkung der Komponenten der Gruppe A und B. Jede Einzelkomponente hat einen bakteriostatischen Effekt, aber in Kombination wirken sie bakteriozid (Conti et al., 1997). Die Streptogramine wurden in den 1950er Jahren entdeckt (Mukhtar und Wright, 2005). Da die geringe Wasserlöslichkeit den therapeutischen Nutzen der natürlichen Streptogramine stark einschränkt, wurden sie lange Zeit nur als Additive in der Tiermast eingesetzt, vor allem das von *Streptomyces pristinaespiralis* produzierte Pristinamycin und das von *Streptomyces virginiae* produzierte Virginiamycin (Abb. 1.5).

Streptogramine vom Typ A



Antibiotikum	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	X ₂	X
Pristinamycin I _A , Virginiamycin M ₁ , Ostreogrycin A, Streptogramin A, Vernamycin A, Mikamycin A, PA114A1	Isopropyl	Methyl	Methyl	O		CH
Pristinamycin II _A , Virginiamycin M ₂ , Ostreogrycin G	Isopropyl	Methyl	Methyl	O		CH
Griseoviridin	Methyl	H	H	OH	Cystein (SH verknüpft mit X)	C
Madumycin II	Isopropyl	Methyl	Methyl	OH	Alanin	CH
Dalfopristin	Isopropyl	Methyl	Methyl	O		CH

Streptogramine vom Typ B



Antibiotikum	R ₁	R ₂	R ₃	X
Pristinamycin I _A , Ostreogrycin B, Streptogramin B, Vernamycin B, Mikamycin I _A , PA114B1	Ethyl	Methyl	N(CH ₃) ₂	4-Oxo-Pipecolinsäure
Pristinamycin I _B , Ostreogrycin B ₂ , Vernamycin B ₂	Ethyl	Methyl	NH(CH ₃)	4-Oxo-Pipecolinsäure
Pristinamycin I _C , Ostreogrycin B ₁ , Vernamycin B ₁	Methyl	Methyl	N(CH ₃) ₂	4-Oxo-Pipecolinsäure
Vernamycin B ₀	Methyl	Methyl	NH(CH ₃)	4-Oxo-Pipecolinsäure
Ostreogrycin B ₃	Ethyl	Methyl	N(CH ₃) ₂	3-Hydroxy-4-oxo-Pipecolinsäure
Vernamycin C	Ethyl	Methyl	N(CH ₃) ₂	Aspartat
Virginiamycin S ₁	Ethyl	Methyl	H	4-Oxo-Pipecolinsäure
Virginiamycin S ₂	Ethyl	H	H	4-Hydroxy-Pipecolinsäure
Virginiamycin S ₃	Ethyl	Methyl	H	3-Hydroxy-4-oxo-Pipecolinsäure
Virginiamycin S ₄	Methyl	Methyl	H	4-Oxo-Pipecolinsäure
Patricin A	Methyl	Methyl	H	Pro
Patricin B	Methyl	Methyl	H	Pipecolinsäure
Quinupristin	Ethyl	Methyl	N(CH ₃) ₂	

Abbildung 1.5: Strukturen der Streptogramin-Antibiotika.

Abweichungen der Strukturen der S_B-Antibiotika vom Pristinamycin I_A sind hervorgehoben.

Um diese Probleme zu umgehen, wurden von Rhône-Poulenc die semipräparativen Pristinamycin-Derivate Dalfopristin (S_A-Komponente) und Quinupristin (S_B-Komponente) entwickelt. Ihre wasserlösliche 70:30-Kombination, die unter dem Handelsnamen Synercid auf dem Markt ist, stellt das erste injizierbare Streptogramin-Antibiotikum dar (Barriere et al., 1998b). Es wurde 1999 von der U.S. Food and Drug Administration (FDA) für die Behandlung von durch Gram-positive Bakterien, z.B. Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE) und Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme (MRSA), hervorgerufene Infektionen zugelassen (Eliopoulos, 2003). Das breite Wirkungsspektrum von Synercid schließt aber auch einige wichtige aerobe Gram-negative Bakterien und einige anaerobe Organismen ein (Mukhtar und Wright, 2005).

Die Streptogramine der Gruppe A bestehen aus polyungesättigten Makrolaktonen und sind Hybride zwischen Polyketiden und Polypeptiden (Abb. 1.5). Wichtige Beispiele für S_A-Moleküle sind Pristinamycin II_A, das strukturell identische Virginiamycin M₁ und das semisynthetische Derivat Dalfopristin.

Die Streptogramine der Gruppe B sind strukturell hochdiverse Hexadepsipeptide, die zusätzlich einen hochkonservierten exozyklischen 3-Hydroxy-Picolinsäurerest (HPA) enthalten (Abb. 1.5). Die generelle Zusammensetzung der S_B-Moleküle ist HPA₁ – L-Thr₂ – D-2-Amino-Buttersäure₃ (D-Abu₃) (oder D-Ala₃) – L-Pro₄ – L-Phe₅ (oder L-4-*N,N*-Dimethylamino-Phenylalanin₅ (L-Dmpapa₅) – X₆ – L-Phenylglycin₇ (L-Phg₇). X ist in den meisten Fällen L-4-Oxo- oder L-4-Hydroxy-Pipecolinsäure (Pip), kann aber auch L-Asp oder L-Pro sein (Cocito, 1979). Die Laktonfunktion wird zwischen der sekundären Hydroxylgruppe des *N*-acylierten Thr und der Carboxylgruppe des C-terminalen Phg ausgebildet. Die Peptidbindung zwischen den Positionen 4 und 5 ist in den meisten Fällen *N*-methyliert. Die wichtigsten Beispiele für S_B-Antibiotika sind das Pristinamycin I_A, das Virginiamycin S₁ und das semisynthetische Quinupristin.

1.3.1 Der Wirkungsmechanismus der Streptogramine

Der Angriffsort beider Typen von Streptograminen ist das prokaryotische Ribosom. Diese Translationsmaschinerie ist ein großer Ribonukleoproteinverband, der sich aus zwei Untereinheiten zusammensetzt, der 50S- und der 30S-Untereinheit. Die Streptograminantibiotika vom Typ A und B binden an unterschiedlichen Stellen der 50S-Untereinheit. Die S_B-Moleküle wirken in einer ähnlichen Weise wie die Makrolide und Lincosamide und konkurrieren mit diesen um dieselbe Bindungsstelle am Ribosom. Durch die Bindung dieser Antibiotika, die gemeinsam als MLS_B-Gruppe zusammengefasst werden, wird der Ausgangstunnel für die wachsende Polypeptidkette blockiert. Dies führt zu einer Verhinderung der Proteinelongation nach wenigen Zyklen der Peptidbindungsbildung (Tenson et al., 2003). Die S_A-Antibiotika hingegen interferieren mit der Substratbindung an der Donor- und Akzeptorstelle des Peptidyltransferasezentrums (Chinali et al., 1984). Sie binden an dieses Zentrum bei Abwesenheit von Aminoacyl-tRNAs und blockieren deren Bindung. Dadurch wird der eigentliche Peptidyltransfer verhindert. Dieser Wirkungsmechanismus konnte über die Kristallstrukturanalyse der ribosomalen 50S-Untereinheit von *Haloarcula marismortui* mit gebundenem Virginiamycin M bestätigt werden: In dieser Struktur ist eine Verbrückung der A- und P-Stelle durch dieses Antibiotikum erkennbar (Hansen et al., 2003). Eine wichtige Eigenschaft der S_A-Antibiotika ist außerdem, dass sie durch ihre Bindung die Affinität des Ribosoms zu den S_B-Komponenten 100-fach erhöhen, wodurch sich der Synergismus zwischen den Komponenten erklären lässt (Vannuffel und Cocito, 1996). Der strukturelle Hintergrund dieses Effekts ist Thema des nächsten Abschnitts.

1.3.2 Strukturelle Analyse des Wirkungsmechanismus

Zum Verständnis des Wirkungsmechanismus der Streptogramine hat die Aufklärung der Kristallstruktur der 50S ribosomalen Untereinheit aus *Deinococcus radiodurans* als Komplex mit Dalfopristin und Quinupristin wesentlich beigetragen (Harms et al., 2004) (Abb. 1.6). Die strukturellen Daten zeigen, dass Dalfopristin in einer spezifischen Bindungstasche des Peptidyltransferasezentrums durch ein Netzwerk von hydrophoben Interaktionen gebunden wird und zusätzlich Wasserstoffbrückenbindungen mit den Nukleotiden G2505 und G2061 (*E. coli*-Nummerierung) der 23S rRNA ausbildet. Außerdem tragen alle rRNA-Reste, welche in früheren Studien in Anwesenheit von S_A eine veränderte chemische Reaktivität zeigten (Porse und Garrett, 1999; Rodriguez-Fonseca et al., 1995), zur Bindung von Dalfopristin bei. Der Bindungsmodus verdeutlicht die direkte Konkurrenz der S_A-Komponenten mit den Substraten der A- und P-Stelle des Ribosoms. Weiterhin zeigt die Kristallstruktur die Blockade des Ausgangstunnels für die wachsende Peptidkette durch die S_B-Komponente Quinupristin (Abb. 1.6). Die Kristallstruktur liefert auch eine Erklärung für den beobachteten synergistischen Effekt zwischen den Streptogramin-Komponenten: Zwischen beiden gebundenen Streptograminen bestehen direkte hydrophobe Interaktionen. Außerdem stehen beide Komponenten über Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Interaktionen in direktem Kontakt mit dem 23S rRNA-Nukleotid A2062, welches durch die Bindung der S_A-Antibiotika konformationelle Änderungen erfährt, die die Bindung der S_B-Komponente begünstigen (Cocito et al., 1997).

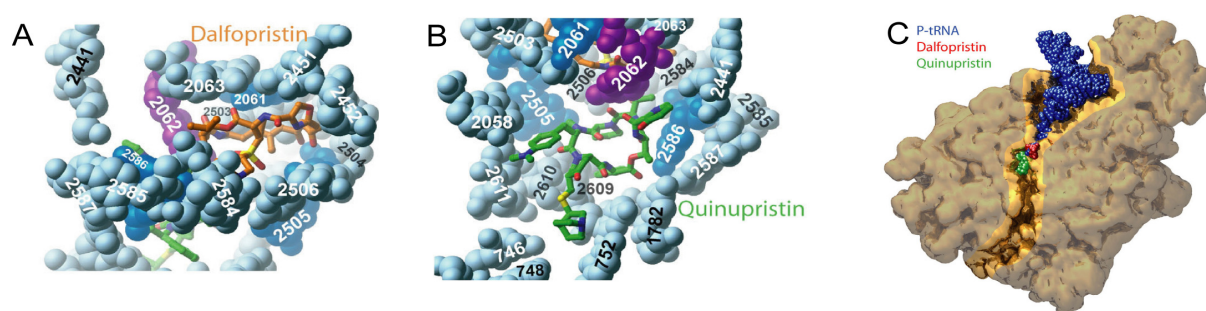


Abbildung 1.6: Kristallstruktur der 50S ribosomalen Untereinheit von *Deinococcus radiodurans* als Komplex mit Dalfopristin und Quinupristin (aus Harms et al., 2004).

Zur Vereinfachung der Darstellung der Interaktionen von Dalfopristin und Quinupristin mit der 23S rRNA wurden rRNA-Basen, die nicht an der Bindung beteiligt sind, weggelassen.

A: Lokale Umgebung von Dalfopristin (orange). A2062 ist violett hervorgehoben. Nukleotide, die durch Wasserstoffbrückenbindungen mit Dalfopristin oder Quinupristin interagieren, sind dunkelblau hervorgehoben.

B: Lokale Umgebung von Quinupristin (grün). Die Farbgebung entspricht der von A.

C: Überblick über die Bindungsstellen von Dalfopristin und Quinupristin in der 50S ribosomalen Untereinheit in Bezug zur tRNA der P-Stelle und dem Ausgangstunnel für die wachsende Peptidkette (golden hervorgehoben).

1.3.3 Biosynthese der Streptogramin B-Antibiotika

Die Biosynthese der S_B-Antibiotika soll im Folgenden am Beispiel von Pristinamycin I_A (PI_A) aus *Streptomyces pristinaespiralis* vorgestellt werden. PI_A wird über das Zusammenspiel von drei NRPSs hergestellt, SnbA (61 kDa), SnbC (276 kDa) und SnbDE (522 kDa) (Abb. 1.7) (de Crecy-Lagard et al., 1997a; de Crecy-Lagard et al., 1997b).

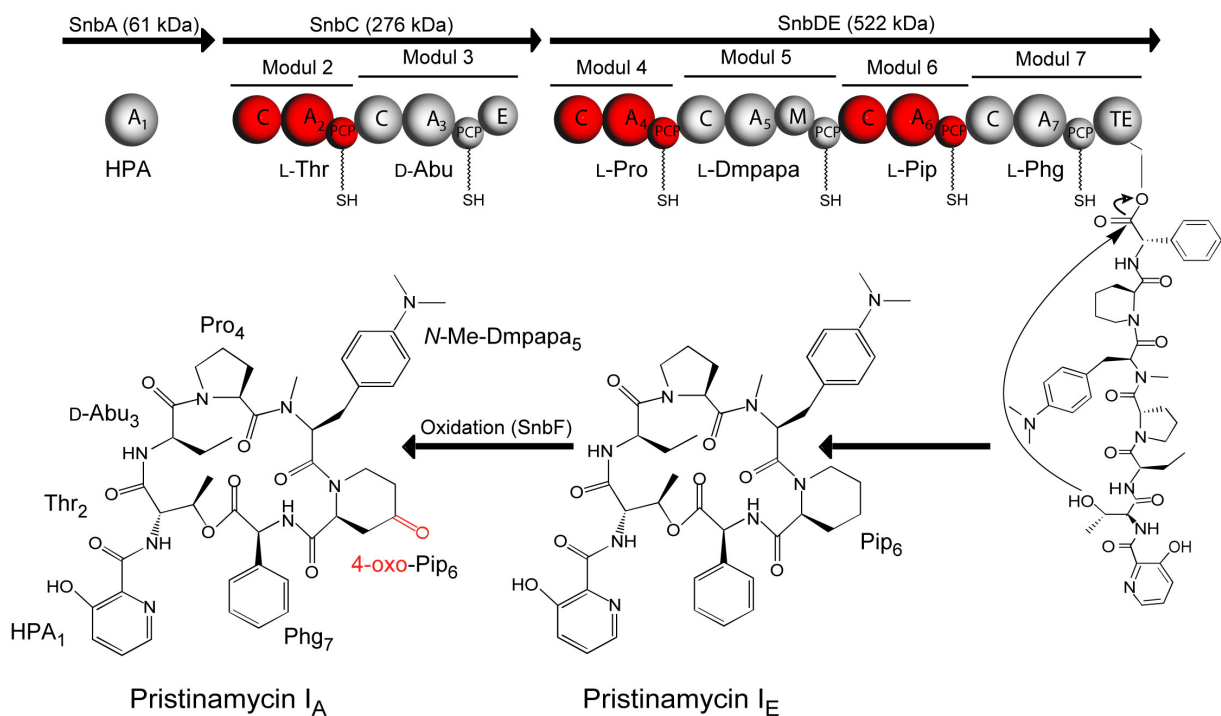


Abbildung 1.7: Biosynthese von Pristinamycin I_A in *Streptomyces pristinaespiralis*.

SH repräsentiert den ppan-Kofaktor, OH den Serinrest des aktiven Zentrums der TE-Domäne (siehe Abschnitt 1.5.1).

SnbF ist an der postsynthetischen Oxidation des Pristinamycin I_E zum Endprodukt beteiligt.

Bei SnbA handelt es sich um ein alleinstehendes Protein, welches für die Adenylierung der N-terminalen 3-Hydroxy-Picolinsäure (HPA) zuständig ist. SnbC enthält zwei Elongationsmodule. Das erste katalysiert den Einbau von L-Thr, das zweite, welches für den Einbau von D-2-Amino-Buttersäure (D-Abu) zuständig ist, enthält zusätzlich eine Epimerisierungsdomäne, was in Einklang mit der beobachteten Stereochemie steht. SnbDE enthält vier Elongationsmodule, die für den Einbau von L-Pro, N-Me-L-4-N,N-Dimethylamino-Phe (N-MeDmpapa), L-Pipecolinsäure (Pip) und L-Phenylglycin (Phg) in das Endprodukt zuständig sind. Das zweite dieser Module enthält eine N-Methylierungsdomäne, die die Methylierung der α -Aminogruppe des Dmpapa katalysiert. Das dritte Modul von SnbDE aktiviert L-Pip anstelle von L-4-oxo-Pip, was an dieser Stelle im PI_A vorliegt. Deshalb wird zunächst das Primärprodukt der nichtribosomalen Peptidsynthese PI_E gebildet, welches

erst nach Abspaltung von der Synthetase unter Beteiligung des Proteins SbnF zu PI_A oxidiert wird (Abb. 1.7) (Thibaut et al., 1997). Das Terminationsmodul inkorporiert L-Phg in das Peptid, und die enthaltene Thioesterasedomäne katalysiert die Abspaltung und Zyklisierung von PI_E .

Betrachtet man die Struktur von PI_A , so fällt ein hoher Anteil an ungewöhnlichen Aminosäuren auf: Zusätzlich zur N-terminalen HPA sind vier der sechs Aminosäuren des PI_A nichtproteinogen. Die Biosynthese dieser vier Aminosäuren und des HPA-Bausteins wurden bisher nur unzureichend untersucht. Es konnte allerdings gezeigt werden, dass die Aminosäure Dmpapa in *Streptomyces pristinaespiralis* durch einen aus den vier Proteinen PapA (Chorismat-Aminotransferase), PapB (Mutase), PapC (Dehydrogenase) und PapM (Methyltransferase) bestehenden Syntheseweg gebildet wird. Die aufeinanderfolgenden Katalysen dieser Enzyme transformieren Chorismat zu Dmpapa (Blanc et al., 1997) (Abb. 1.8). Fütterungsexperimente zeigten, dass Phenylalanin der Vorläufer für den C-terminalen Phg-Rest ist (Reed und Kingston, 1986), während Lys als Quelle für den 4-Oxo-Pip-Baustein und den HPA-Rest identifiziert wurde. Für die Biosynthese der letzten beiden wurden durch Sequenzierung im Virginiamycin S-Biosynthesecoluster von *Streptomyces virginiae* die vier Proteine VisA (Lys 2-Aminotransferase), VisB (HPA-AMP-Ligase), VisC (Lys-Zyklodeaminase) und VisD (P450-Oxidase) identifiziert (Namwat et al., 2002b). Auf Basis von Sequenzvergleichen wird vermutet, dass diese Proteine an der Umwandlung von Lysin zu 4-Oxo-Pip und HPA und deren Einbau in Virginiamycin S beteiligt sind (Namwat et al., 2002a) (Abb. 1.8).

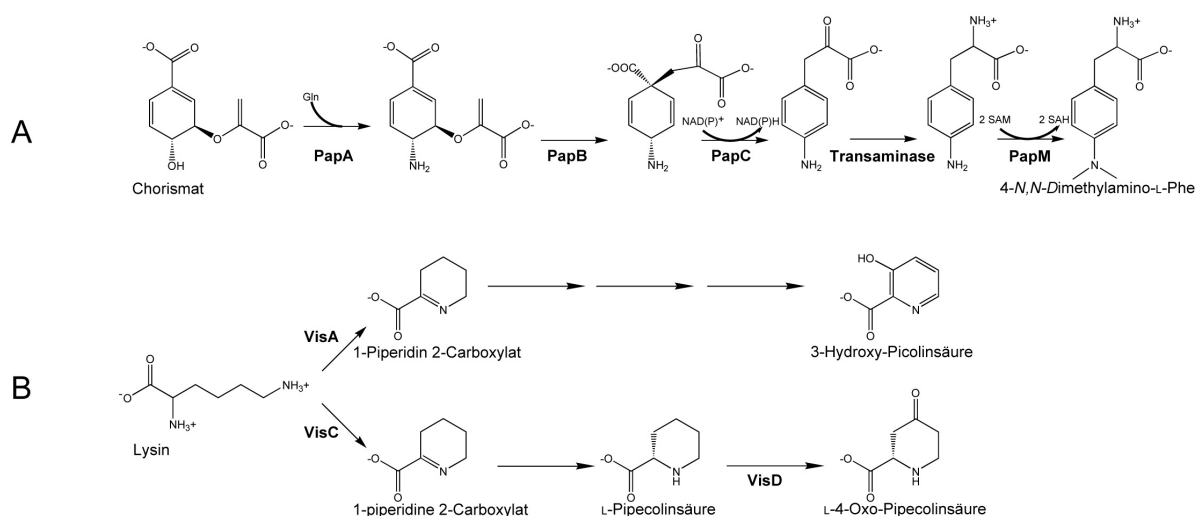


Abbildung 1.8: Biosynthese von nichtproteinogenen Aminosäuren während der S_B -Synthese.

A: Biosynthese von Dmpapa in *Streptomyces pristinaespiralis*.

B: Vorgeschlagener Biosyntheseweg für HPA und 4-Oxo-Pip in *Streptomyces virginiae*.

1.4 Die Antibiotikaklasse der aziden Lipopeptide

Ein weiterer Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Biosynthese der nichtproteinogenen Aminosäure 3-Methyl-Glutamat (3-MeGlu), die einen wichtigen Baustein der aziden Lipopeptid-Antibiotika darstellt. Die Strukturen, die Biosynthese und die Eigenschaften dieser Naturstoffe werden im Folgenden kurz vorgestellt.

Bei den aziden Lipopeptide handelt es sich um eine Naturstoffklasse mit einer außerordentlichen strukturellen Diversität. Wichtige Mitglieder sind das Kalzium-abhängige Antibiotikum (CDA) aus *Streptomyces coelicolor* (Hojati et al., 2002), Daptomycin aus *Streptomyces roseosporus* (Raja, 2003), und A54145 aus *Streptomyces fradiae* (Fukuda, 1990) (Abb. 1.9). Jedes dieser Antibiotika besteht aus einer Gruppe individueller Verbindungen, die sich durch die N-terminale Fettsäure oder die Zusammensetzung des Peptidrückgrats unterscheiden.

Die ausgesprochen hohe Diversität unter den aziden Lipopeptiden kommt durch einen großen Anteil von D-konfigurierten und nichtproteinogenen Aminosäuren zustande, wie z.B. D-4-Hydroxy-Phenylglycin, D-3-Phospho-Hydroxy-Asparagin, 3-Methyl-Glutamat, D-Pipecolinsäure, Kynurenin und viele andere. Alle aziden Lipopeptide bestehen aus verzweigt-zyklischen Dekapeptid-Lakton- oder Laktam-Ringen. Die Positionen von D-konfigurierten Aminosäuren sind in diesen Strukturen hochkonserviert. Außerdem finden sich in allen Strukturen zwei Aspartatreste in equivalenten Ringpositionen. Das Vorhandensein zahlreicher weiterer Biosynthesegencluster für die Produktion von aziden Lipopeptiden lässt vermuten, dass noch viele weitere Antibiotika dieser Klasse gefunden werden können (Micklefield, 2004).

Das azide Lipopeptid-Antibiotikum Daptomycin hat eine große therapeutische Bedeutung. Es wurde in den USA im Jahr 2003 durch die FDA unter dem Handelsnamen Cubicin® (Daptomycin zur Injektion) zur Behandlung von Hautinfektionen, die durch Gram-positive Bakterien hervorgerufen werden, zugelassen. Es repräsentiert die erste neue antibakterielle Naturstoffklasse, welche in den letzten drei Jahrzehnten für den klinischen Gebrauch zugelassen wurde (Baltz et al., 2005). Interessanterweise zeigt Daptomycin bakteriozide Aktivität gegen resistente Krankheitserreger, gegen die es nur sehr wenig therapeutische Alternativen gibt. Beispiele sind Vancomycin-resistente Enterokokken (VRE), Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus*-Stämme und Penicillin-resistente *Streptococcus pneumoniae* (PRSP)-Stämme (Tally und DeBruin, 2000). Bis jetzt gibt es erst wenige Beispiele von Resistenzbildung gegen Daptomycin, was wohl auf seinen einzigartigen Wirkungsmechanismus zurückzuführen ist (Raja, 2003).

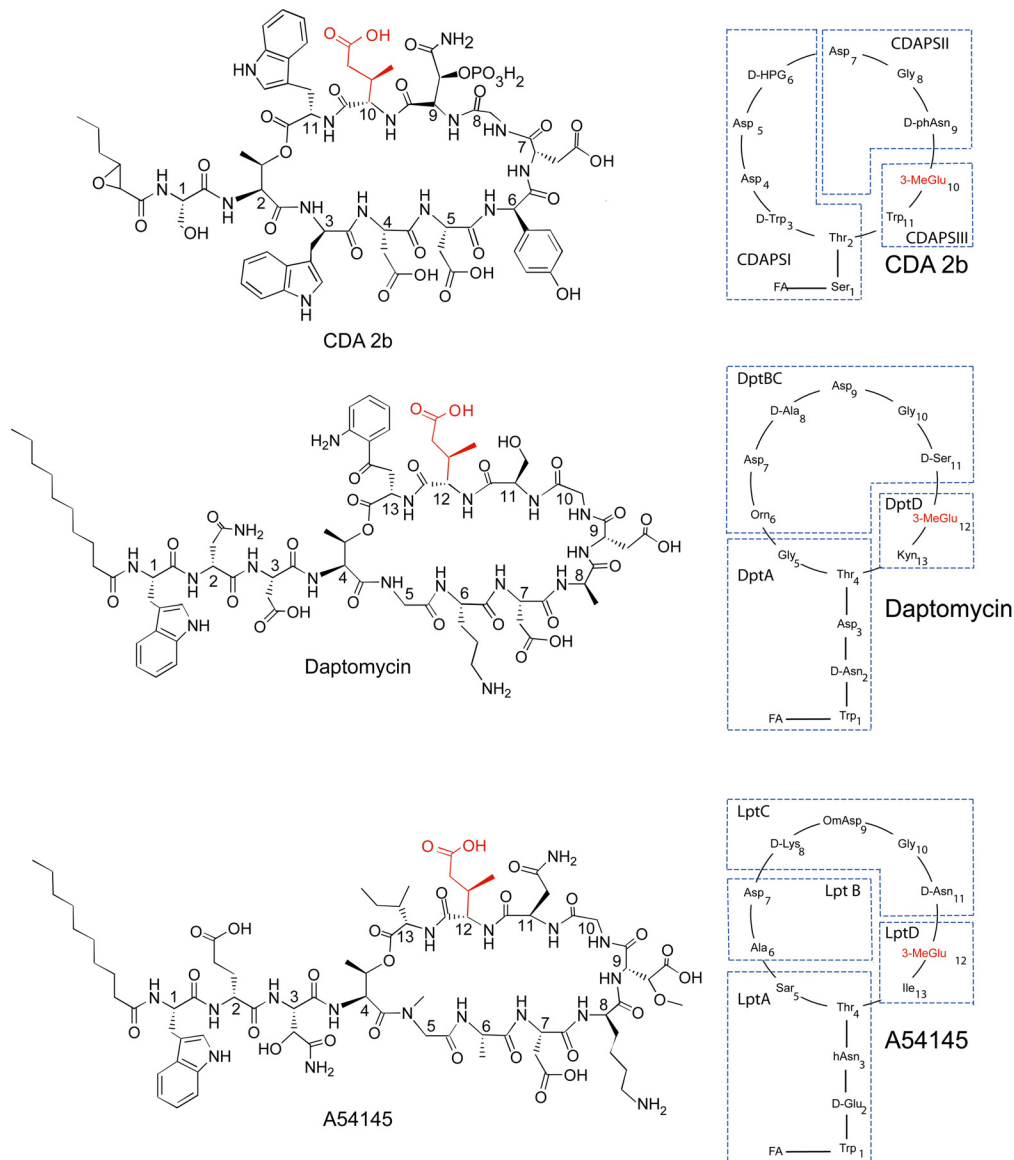


Abbildung 1.9: Struktur und Diversität der aziden Lipopeptide.

Gezeigt sind beispielhaft Strukturen von Verbindungen, die zu den aziden Lipopeptiden CDA, Daptomycin und A54145 gehören. Die Schemata auf der rechten Seite zeigen die Modulverteilung der zugehörigen Peptidsynthetasen. Der konservierte 3-MeGlu-Rest ist rot hervorgehoben.

FA, Fettsäure; CDAPSI-III, CDA-Peptidsynthetase I-III; DptA-D, Daptomycin-Peptidsynthetase A-D; LptA-D, A54145-Peptidsynthetase A-D.

Dieser Mechanismus ist zwar noch nicht völlig verstanden, aber es konnte gezeigt werden, dass Kalzium-Ionen eine wichtige Rolle für die Bioaktivität der aziden Lipopeptide spielen (Jones und Barry, 1987; Jung et al., 2004). Unterstützt durch detaillierte NMR-Studien entwickelten Jung et al. ein Modell, nach dem nach der Bindung von Kalzium-Ionen durch eine Konformationsänderung die Amphiphilie von Daptomycin zunimmt. Dadurch wird die Interaktion mit neutralen oder aziden bakteriellen Membranen erleichtert, was zur Bindung an

die Zytoplasma-Membran des Zielbakteriums führt. Nach dieser Bindung sagt das Modell eine weitere Ca^{2+} -abhängige Neuordnung voraus, welche ein tieferes Vordringen des Daptomycins in die Lipiddoppelschicht hervorruft (Jung et al., 2004). Dies bewirkt ausgeprägte Störungen der Membranstruktur, welche Lipid-Flip-Flops und Lecks in der Membran beinhalten. Einige dieser Störungen führen vermutlich zum Verlust der funktionalen Integrität der Membran, was zum Zelltod der Gram-positiven Organismen führt. Obwohl manche der strukturellen Voraussetzungen für die antibakterielle Aktivität von Daptomycin ermittelt werden konnten, bleiben die exakten molekularen Angriffspunkte in der Zytoplasmamembran weiterhin unklar. Die Gemeinsamkeiten in den Strukturen anderer azider Lipopeptide lassen aber vermuten, dass diese Moleküle einen ähnlichen Wirkungsmechanismus aufweisen.

1.4.1 Biosynthese der aziden Lipopeptide

Die aziden Lipopeptide CDA, Daptomycin und A54145 werden über nichtribosomale Peptidsynthese hergestellt (Abb. 1.9). Das CDA-Synthesystem besteht aus den drei enzymatischen Untereinheiten CDAPSI, CDAPSII und CDAPSI (Hojati et al., 2002). Die Daptomycin-Synthese wird von den drei Synthetasen DptA, DptBC und DptD ausgeführt (Miao et al., 2005), während das nah verwandte A54145 durch die Synthetasen LptA, LptB, LptC und LptD produziert wird (Miao et al., 2006).

Zusätzlich zu den NRPS-Synthetasen werden in den Biosynthesegenclustern der aziden Lipopeptide noch viele weitere Proteine kodiert, die z.B. an der Biosynthese der N-terminalen Fettsäuren und nichtproteinogener Aminosäuren oder an der Resistenzvermittlung beteiligt sind (siehe Anhang). Für viele dieser Proteine wurde eine Aufgabe in der Biosynthese vorgeschlagen, die Funktion einiger Proteine ist aber noch völlig unklar. Über den Mechanismus der N-terminalen Lipidierung der aziden Lipopeptide ist nur wenig bekannt. Im Fall von Daptomycin spielen höchstwahrscheinlich die Genprodukte von *dptE* und *dptF* eine Rolle für diese Modifizierung (Miao et al., 2005). DptE enthält konservierte Motive, die typisch für Adenylat-bildende Enzyme sind und aktiviert die Fettsäure daher wahrscheinlich als Acyl-Adenylat. DptF zeigt starke Sequenzhomologien zu ppan-bindenden Acyl-Carrier-Proteinen (ACPs). Es wird vermutet, dass die als gemischtes Anhydrid aktivierte Fettsäure auf DptF übertragen wird. DptF könnte dann mit der Starter-C-Domäne der Peptidsynthetase DptA interagieren, welche die Peptidbindung zwischen dem PCP-gebundenen Tryptophan und der ACP-gebundenen Fettsäure katalysieren würde.

1.4.2 Eigenschaften und Biosynthese des 3-MeGlu-Restes

Ein ungewöhnliches Strukturmerkmal der aziden Lipopeptide ist ein 3-Methyl-Glutamat (3-MeGlu)-Rest, der in den Dekapeptid-Lakton-Ringen von CDA, Daptomycin und A54145 an äquivalenten Ringpositionen konserviert ist (Abb. 1.9). Interessanterweise findet man diese Aminosäure in der Natur ausschließlich in diesen drei Naturstoffen, obwohl bereits sehr viele Sekundärmetabolite mit verschiedensten nichtproteinogenen Aminosäuren identifiziert wurden (Nguyen et al., 2006). Während CDA von *S. coelicolor* und A54145 von *S. fradiae* als Substanzgemische von Verbindungen produziert werden, die Glu oder 3-MeGlu an der vorletzten Ringposition enthalten, wird Daptomycin von *S. roseosporus* ausschließlich als Gemisch von 3-MeGlu enthaltenden Peptiden produziert (Nguyen et al., 2006). Für Daptomycin und CDA konnte gezeigt werden, dass es sich bei dem 3-MeGlu Rest um das (2*S*,3*R*)-Diastereomer handelt (Debono et al., 1987; Milne et al., 2006). In allen bisher getesteten aziden Lipopeptiden weisen die 3-MeGlu enthaltenden Verbindungen eine höhere Bioaktivität auf, als die Glu enthaltenden Analoga (Counter et al., 1990; Grünewald et al., 2004a; Kopp et al., 2006a; Milne et al., 2006; Nguyen et al., 2006). Aufgrund seiner niedrigen aber signifikanten Sequenzhomologien zu Methyltransferasen wurde vorgeschlagen, dass das Gen SCO3215 aus dem CDA-Biosynthesegencluster von *S. coelicolor* eine *S*-Adenosyl-Methionin (SAM)-abhängige Glutamat-3-Methyltransferase (GlmT) kodiert, die für die Biosynthese des 3-MeGlu zuständig ist (Hojati et al., 2002). In den Biosynthesegenclustern von Daptomycin und A54145 in *S. roseosporus* und *S. fradiae* wurden die Gene *dptI* und *lptI* gefunden, welche Proteine kodieren, die große Ähnlichkeit zu GlmT aufweisen (DptI: 36% Identität, 49% Ähnlichkeit; LptI: 31% Identität, 48% Ähnlichkeit). Eine Fermentation von Deletionsmutanten von *S. coelicolor* (Δ *glmT*) und *S. roseosporus* (Δ *dptGHIJ*) führte in beiden Fällen zur Produktion von CDA- und Daptomycin-Analoga, die ausschließlich Glu anstatt 3-MeGlu enthalten (Milne et al., 2006; Nguyen et al., 2006). Außerdem führte eine Komplementation der Δ *dptGHIJ*-Mutante durch *dptI* oder *glmT* und eine Komplementation der Δ *glmT*-Mutante durch die Fütterung mit 3-MeGlu zur Wiederherstellung der Biosynthese der 3-MeGlu enthaltenden Verbindungen (Milne et al., 2006; Nguyen et al., 2006). Diese Ergebnisse zeigen, dass GlmT, DptI und voraussichtlich auch LptI Methyltransferasen sind, die an der Biosynthese des 3-MeGlu-Restes der aziden Lipopeptide beteiligt sind. Das genaue Substrat, der Mechanismus der Methylierungsreaktion und die Natur möglicher weiterer Schritte in dem Biosyntheseweg bleiben jedoch unklar.

Eine schematische Übersicht über die Biosynthese weiterer nichtproteinogener Aminosäuren der aziden Lipopeptide findet sich im Anhang.

1.5 Peptidzyklisierung durch Thioesterasedomänen

Thioesterasedomänen befinden sich am C-Terminus des Terminationsmoduls der NRPSs und sind für die Abspaltung des Peptids von der Synthetase zuständig (siehe Abschnitt 1.2.1). Die Abspaltung geschieht meist durch Makrozyklisierung des an das vorangehende PCP gebundenen Peptidvorläufers. Für diesen Schritt sind verschiedene Zyklisierungsstrategien bekannt, was zur hohen Diversität von nichtribosomalen Zyklopeptiden beiträgt. Zum Beispiel führt der intramolekulare Ringschluss über Amine zur Ausbildung von peptidischen Makrolaktamen, wie z.B. in den Peptidantibiotika Tyrocidin A (**9**), Bacitracin (**10**) und Gramacidin S (**11**), während die Zyklisierung über Hydroxylgruppen peptidische Makrolaktone ergibt, wie z.B. bei den aziden Lipopeptiden und Streptogramin B Antibiotika, dem antifungalen Lipopeptid Fengycin (**12**) und dem Biosurfaktant Surfactin A (**13**) (Sieber und Marahiel, 2003) (Abb. 1.10).

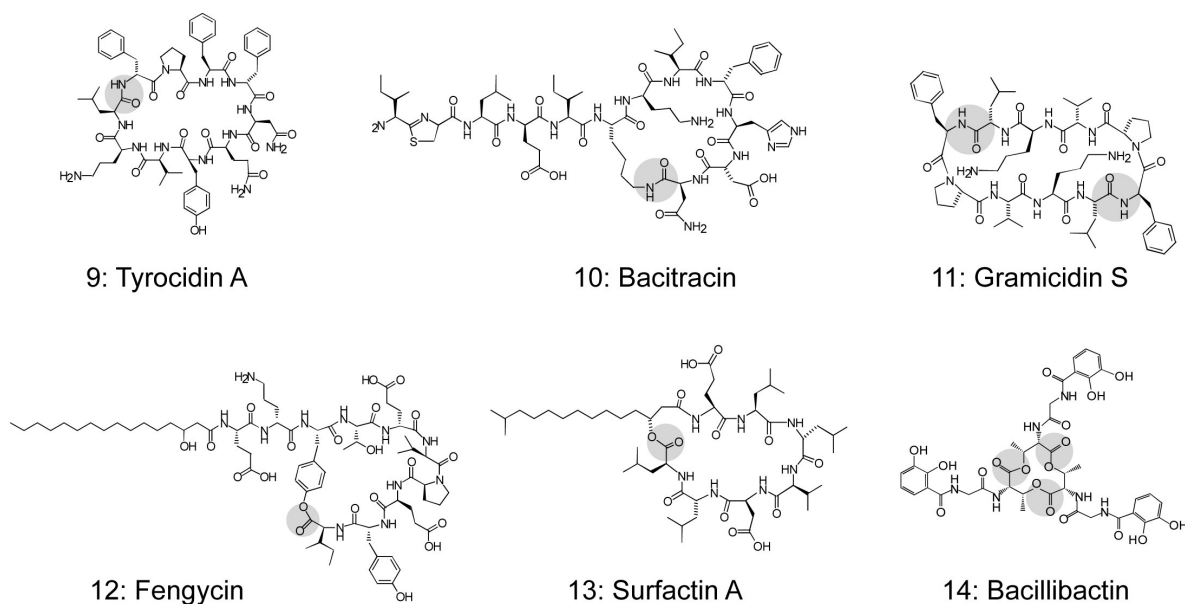


Abbildung 1.10: Auswahl nichtribosomaler Peptide, die verschiedene Zyklisierungsstrategien repräsentieren.

Die durch TE-Domänen geknüpften Ester- bzw. Amidbindungen sind grau unterlegt.

Für Makrolaktame besteht sowohl die Möglichkeit einer Kopf-zu-Schwanz-Zyklisierung über die α -Aminogruppe der N-terminalen Aminosäure, wodurch geschlossene Makrozyklen entstehen, z.B. Tyrocidin A und Gramacidin S, als auch die Zyklisierung über die Aminogruppe einer Aminosäureseitenkette, wodurch Makrozyklen mit Lasso-Struktur entstehen, z.B. Bacitracin. Bei Makrolaktonen führen analoge Strategien zu verzweigt-kettigen Makrozyklen, wie im Tyrocidin, wo die Zyklisierung über eine Hydroxylgruppe einer Tyrosin-Seitenkette erfolgt, oder im Bacitracin, wo das Zyklisierungsnukleophil die

Hydroxylgruppe einer β -hydroxylierten Fettsäure ist. Weitere interessante Zyklisierungsstrategien sind Zyklooligomerisierungen, die durch iterativ agierende TE-Domänen katalysiert werden. Hier werden kurze identische Peptiduntereinheiten durch die TE-Domäne linear verknüpft und anschließend zyklisiert. Eine Zyklodimerisierung führt beispielsweise zur Bildung des Makrolaktams Gramicidin S (Kohli et al., 2001), während eine Zyklotrimerisierung das peptidische Siderophor Bacillibactin (**14**) ergibt (May et al., 2001). Im Folgenden soll auf den katalytischen Mechanismus, die *in vitro*-Aktivität und das synthetische Potential von rekombinanten TE-Domänen (Zyklasen) eingegangen werden.

1.5.1 Mechanismus der Peptidzyklisierung

Die TE-Domänen der NRPSs sind Mitglieder der sogenannten α,β -Hydrolase-Enzymsuperfamilie. Sie nutzen ein konserviertes Serin, das Teil einer aus Ser, His und Asp bestehenden katalytischen Triade ist, als katalytisch aktiven Rest. Die Hydroxylgruppe dieses Serins führt einen nukleophilen Angriff auf den am benachbarten PCP gebundenen Peptidylthioester aus, wodurch sich ein Acyl-*O*-TE-Intermediat ausbildet, und die freie Thiolgruppe des ppan-Kofaktors des PCPs regeneriert wird (Kohli und Walsh, 2003). Der gebildete Oxoester kann nun entweder von einem Nukleophil der gebundenen Peptidkette intramolekular oder von vorhandenem Wasser intermolekular angegriffen werden. Im ersten Fall entsteht das Makrozyklisierungsprodukt (Abb. 1.11) (z.B. Daptomycin), im zweiten Fall entsteht die freie lineare Peptidsäure (z.B. Vancomycin).

Erste strukturelle und mechanistische Erkenntnisse über durch TE-Domänen katalysierte Peptidzyklisierungen wurden aus der Kristallstrukturanalyse der Surfactin-Zyklase (SrfC-TE) gewonnen (Bruner et al., 2002). Die Ergebnisse dieser Studie zeigten Ähnlichkeiten zu Strukturen anderer Enzyme der α,β -Hydrolase-Superfamilie. Der auffälligste Unterschied zu diesen Strukturen ist eine Insertion von drei α -Helices, die über das aktive Zentrum ragt. Die Aminosäuresequenz dieses „Deckels“ (Lid-Region) weicht deutlich von denen anderer TE-Domänen ab, weshalb vermutet wird, dass diese nichtkonservierte Region eine große Bedeutung für die Substratspezifität der Zyklasen hat (Kohli und Walsh, 2003). Die nichtkonservierten Reste gehen vermutlich spezifische Interaktionen mit dem in der SrfC-TE gebundenen Peptid ein.

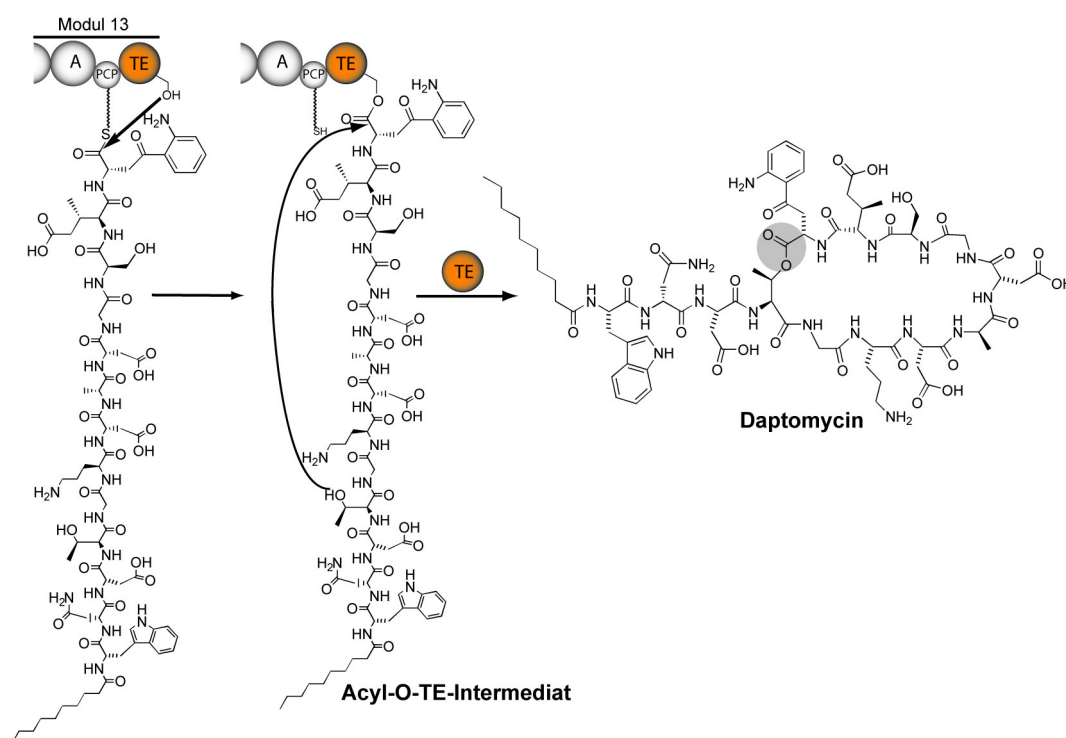


Abbildung 1.11: Katalytischer Mechanismus makrozyklisierender Thioesterasedomänen am Beispiel von Daptomycin.

Die Tridekapeptidyl-Kette des Daptomycins, die an den ppan-Kofaktor des PCP des Terminationsmoduls gebunden ist, wird auf das aktive Serin der TE-Domäne übertragen, wodurch sich ein Acyl-O-TE-Intermediat ausbildet. Der nachfolgende Angriff eines intramolekularen Nukleophils (L-Thr₄) auf die Oxoesterbindung führt zur Freisetzung des verzweigt-zyklischen Makrolaktons Daptomycin.

Im Kontext der nichtribosomalen Peptidsynthese interagiert die TE-Domäne mit dem *upstream* gelegenen PCP, welches die ppan-gebundene Peptidkette anreicht. In der Struktur der SrfC-TE wurde eine mutmaßliche Interaktionsstelle identifiziert, welche das Andocken der C_α-Kette des PCP erlaubt.

Die an den 20 Å langen ppan-Arm gebundene Peptidkette wird über eine tiefe Spalte in das aktive Zentrum der globulären Zyklase gereicht und auf das konservierte aktive Ser₈₀ übertragen, dass zusammen mit His₂₀₇ und Asp₁₀₇ die oben erwähnte katalytische Triade bildet. Durch Kokristallisationsstudien mit einem Boronsäureinhibitor konnte eine spezifische Bindung der beiden C-terminalen Aminosäuren Leu₇ und D-Leu₆ des Surfactin-Peptids im aktiven Zentrum gezeigt werden (Tseng et al., 2002).

Vor kurzem wurde die Kristallstruktur der TE-Domäne der Fengycin-Synthetase (Fen-TE) aufgeklärt (Samel et al., 2006). Diese zweite Kristallstruktur einer NRPS-TE-Domäne weist Unterschiede zur Struktur der SrfC-TE auf und erlaubt einige Verallgemeinerungen zur prinzipiellen Funktionsweise der TE-katalysierten Peptidzyklisierung. Der Hauptunterschied

zwischen den Strukturen besteht darin, dass die Fen-TE ein offenes Canyon-artiges aktives Zentrum besitzt, das nicht durch flexible Regionen der Lid-Region blockiert wird. Die SrfC-TE mit ihrer beschriebenen „offenen“ und „geschlossenen“ Konformation der Lid-Region (Bruner et al., 2002) übt hingegen eine stärkere sterische Kontrolle auf die Substratbindung und die Katalyse aus. Im Kontext beider Strukturen lässt sich vermuten, dass die Lid-Regionen den unerwünschten Zugang von makrozyklischen Substraten ins aktive Zentrum beschränken und gleichzeitig an der Substratbindung beteiligt sind (Samel et al., 2006). Durch eine Kombination von Molekulardynamik-Simulationen der Bindung von Fengycin an die Fen-TE und von *in vitro*-Aktivitätstests konnte ein Modell des Fen-TE-Fengycin-Komplexes entwickelt werden. Dieses Modell zeigt, dass spezifische Interaktionen der Fengycin-Seitenketten mit Proteinseitenketten entlang des Canyons des aktiven Zentrums für die Peptidzyklisierung notwendig sind (Samel et al., 2006).

1.5.2 *In vitro*-Zyklisierungsaktivität rekombinanter TE-Domänen

Das breite pharmakologische Potential vieler zyklischer Peptide erklärt ihre bedeutende Rolle für die Entdeckung neuer Wirkstoffe (Sieber und Marahiel, 2005). Aufgrund ihrer spezifischen Interaktionen mit definierten zellulären Strukturen und durch ihre Stabilität gegen proteolytischen Abbau sind Zylopeptide daher vielversprechende Leitstrukturen für neue Arzneimittel. Die moderne organische Chemie hat bei der zuverlässigen Produktion von Zylopeptiden mit vielen Schwierigkeiten zu kämpfen. Oftmals beobachtet man eine ungenügende Stereo- und Regiochemie im Zyklisierungsschritt und erzielt nur geringe Ausbeuten (Davies, 2003; Sewald und Jakubke, 2002a). NRPS-TE-Domänen katalysieren *in vivo* im Kontext der Synthetasen eine regio- und stereoselektive Peptidzyklisierung von linearen Vorläufern ohne die Verwendung von Schutzgruppen, was den Schluss nahelegte, dass die synthetischen Probleme mit ihrer Hilfe überwunden werden könnten. Diese Vermutung führte zur Entwicklung eines chemoenzymatischen Ansatzes, der die Verwendung von rekombinanten NRPS-TE-Domänen für die Synthese von Zylopeptiden in zellfreien Systemen erlaubt (Trauger et al., 2000). Für diesen Ansatz benötigt man eine Übersetzung zwischen den Sprachen der Chemie und der Biologie: Erstens wird die komplexe NRPS-Multienzym-Maschinerie, die für die Peptidelongation benötigt wird, durch gut etablierte Peptidfestphasensynthese (SPPS) ersetzt, wodurch eine schnelle und einfache Synthese von linearen Peptiden auch mit nichtproteinogenen Aminosäuren ermöglicht wird (Sewald und Jakubke, 2002a). Zweitens wird die TE-Domäne für die *in vitro*-Peptidzyklisierung als ein isoliertes Enzym genutzt, weil die enorme Größe des gesamten

Multienzymkomplexes diverse präparative Probleme mit sich bringen würde. Drittens wird, um eine Acylierung der alleinstehenden TE-Domäne zu gewährleisten, die natürliche PCP-gebundene prosthetische Phosphopantethein-Gruppe durch ein Imitat des Kofaktors ersetzt, welches an das C-terminale Ende der chemisch synthetisierten Peptide angefügt wird. Die beschriebene chemoenzymatische Strategie wurde das erste Mal am Beispiel der TE-Domäne der Tyrocidin-Synthetase aus *Bacillus brevis* angewendet (Trauger et al., 2000) (Abb. 1.12).

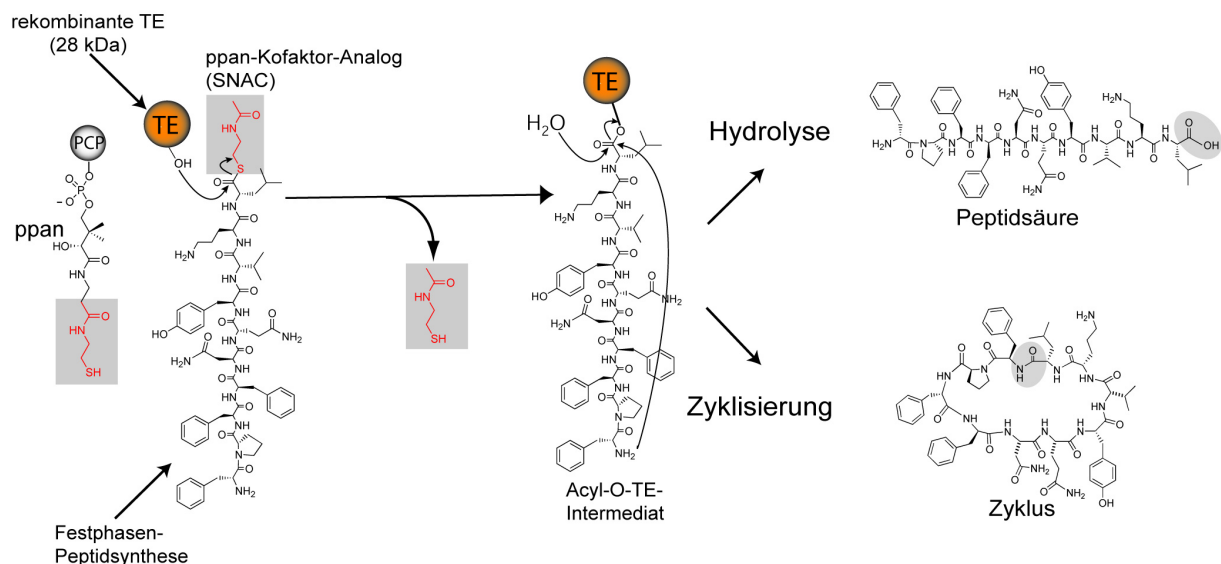


Abbildung 1.12: Chemoenzymatischer Ansatz der TE-katalysierten Peptidzyklisierung am Beispiel der TycC-TE (nach Grünewald und Marahiel, 2006).

Die NRPS-Multienzym-Maschinerie der Tyrocidinsynthese wird durch Festphasen-Peptidsynthese ersetzt. Die TE-Domäne wird als rekombinantes Enzym für die *in vitro*-Peptidzyklisierung genutzt. Die Erkennung des künstlichen Substrats durch die TE-Domäne wird durch die Thioesterifizierung des Peptids mit der Abgangsgruppe SNAC gesichert, die den terminalen Teil des ppan-Kofaktors des PCP imitiert.

Die Inkubation eines chemisch synthetisierten Tyrocidin-Dekapeptidyl-*N*-Acetyl-Cysteamin (SNAC)-Thioesters und der rekombinanten Tyrocidin-Zyklase (TycC-TE) führte zur Bildung des zyklischen Dekapeptid-Antibiotikums Tyrocidin A. Als Nebenreaktion wurde zu einem geringeren Anteil Hydrolyse des Substratanalogons beobachtet, was sich durch die fehlende hydrophobe Umgebung des Multienzymkomplexes erklären lässt. Neuere Resultate zeigen, dass die Interaktion der isolierten Tyc TE mit Detergenz-Mizellen die natürlichen Kontakte mit der Synthetase nachahmen kann, was zu einer signifikanten Verbesserung des Zyklisierungs-zu-Hydrolyse-Verhältnisses führt (Yeh et al., 2004b).

Eine genaue Untersuchung der Substratspezifität der TycC-TE ergab eine hohe Toleranz für Aminosäuresubstitutionen in den linearen Substraten (Trauger et al., 2000), für die Länge der Peptidylthioester-Substrate (Kohli et al., 2001) und für die Identität des Zyklisierungsnukleophils (Trauger et al., 2001). So ist diese Zyklase in der Lage, die Bildung

von Makrozyklen von 6-14 Resten Länge und außerdem neben der Bildung von Makrolaktamen auch die Bildung von Makrolatonen zu katalysieren. In weiteren Untersuchungen wurden Blöcke von jeweils drei Aminosäuren des Substrats durch flexible Abstandhalter und einzelne Amidbindungen durch Esterbindungen ersetzt. Diese Untersuchungen ergaben, dass produktähnliche intramolekulare Wasserstoffbrücken der Substrate die Zyklisierung durch eine Vorfaltung der Peptidkette erleichtern (Trauger et al., 2001).

Um eine allgemeine Anwendbarkeit von NRPS-TE-Domänen zur Synthese einer Reihe unterschiedlicher makrozyklischer Verbindungen zeigen zu können, wurden rekombinante Peptidzyklasen anderer NRPS-Systeme hergestellt und charakterisiert. Beispiele sind die rekombinanten Zyklasen der Surfactin-Synthetase (SrfC-TE) (Kohli et al., 2001; Tseng et al., 2002) und der CDA-Synthetase (CDAIII-TE) (Grünwald et al., 2004b).

1.5.3 Chemoenzymatische Ansätze zur Synthese neuer Zyklopeptide

Um rekombinante Peptidzyklasen für die Herstellung neuer Moleküle mit verschiedensten therapeutischen Eigenschaften nutzen zu können, ist eine hohe Substrattoleranz dieser Enzyme nötig. Für die TycC-TE konnte gezeigt werden, dass sie in der Lage ist, Peptide zu zyklisieren, in denen bis zu sieben der zehn Aminosäurereste des Tyrocidins gleichzeitig durch andere Reste ersetzt wurden (Kohli et al., 2002a). Durch Makrozyklisierung von Peptiden, die eine integrierte RGD-Peptidsequenz enthielten, konnten wirksame Inhibitoren der Ligandenbindung durch Integrin-Rezeptoren erhalten werden (Abb. 1.13). Es entstanden also Moleküle mit einer völlig neuen Bioaktivität. In weiteren Studien wurden über die TycC-TE ϵ -Aminosäuren in zyklische Peptide eingebaut, was zur Bildung von makrozyklischen Polyketid/Tyrocidin-Hybriden führte (Kohli et al., 2003) (Abb. 1.13). Weiterhin erlaubte der Einbau von (*E*)-Alken-Dipeptid-Isosteren die Möglichkeit der postsynthetischen Modifikation durch chemische Metathese (Garbe et al., 2004). Die hohe Substrattoleranz der TycC-TE erlaubte weiterhin die Synthese von glykosylierten Tyrocidin-Varianten (Abb. 1.13) (Lin et al., 2004).

Das beobachtete große synthetische Potential der chemoenzymatischen Peptidzyklisierung ermöglichte die schnelle und einfache Untersuchung von Struktur-Aktivitäts-Beziehungen von medizinisch relevanten nichtribosomalen Peptidantibiotika (Abb. 1.13). In diesem Bereich wurden die aziden Lipopeptide besonders intensiv untersucht (Grünwald et al., 2006). Die rekombinanten Zyklasen der NRPS-Synthetasen von CDA, Daptomycin und A54145 erwiesen sich als vielseitig anwendbare Hilfsmittel für die Synthese von Derivaten

dieser wichtigen Naturstoffe: In ersten Studien wurde die enorme Substrattoleranz der CDA-Zyklase ausgenutzt, um Derivate des klinisch bedeutsamen Daptomycins herzustellen (Grünewald et al., 2004a). Diese Derivate erlaubten die detaillierte Untersuchung des Einflusses einzelner Aminosäurereste auf die Bioaktivität des Daptomycins. Die Charakterisierung der rekombinanten Thioesterasen der Daptomycin-Synthetase DptD (DptD-TE) und der A54145-Synthetase LptD (LptD-TE) erweiterte den Satz an enzymatischen Werkzeugen zur Synthese von Derivaten der aziden Lipopeptide noch (Kopp et al., 2006a). So konnte die Wichtigkeit einzelner Aminosäurereste, insbesondere des 3-MeGlu, für die Bioaktivität der aziden Lipopeptide belegt werden. Weiterhin wurde die CDA-Zyklase verwendet, um über einen Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET)-basierenden Ansatz die Peptidzyklisierung in Echtzeit zu verfolgen (Grünewald et al., 2005). Dies ermöglicht für die Zukunft ein Hochdurchsatz-Screening von enzymatischen Peptidzyklisierungen, was für einen evolutiven Ansatz der Änderung der Substratspezifität von rekombinanten Zyklasen von Bedeutung ist.

Ein weiteres Beispiel für die erfolgreiche Modifizierung von nichtribosomalen Peptiden durch chemoenzymatische Synthese ist der erfolgreiche Einbau von synthetischen heterozyklischen Bausteinen wie Thiazolen und Oxazolen in das Rückgrat des verzweigt-zyklischen Antibiotikums Bacitracin A (Wagner et al., 2006). Durch diesen Ansatz konnten neue Bacitracin-Derivate hergestellt werden, die eine veränderte antibiotische Aktivität aufweisen. Vor kurzem wurde eine *in vitro*-Charakterisierung der iterativ arbeitenden rekombinanten PCP-TE-Domäne der Gramicidin S-Synthetase publiziert (Hoyer et al., 2007). Die Inkubation dieses Enzym mit linearen Pentapeptidyl-SNAC-Substraten führt zur Dimerisierung und nachfolgenden Zyklisierung des Substrats, wodurch das Zyklodimer Gramicidin S entsteht (Abb.1.13). Interessanterweise kann dieses Enzym auch Substrate mit verschiedenen Ringgrößen umsetzen, was außer zur Dimerisierung auch zur Trimerisierung der Vorläufer und zur Bildung verschiedener Ringgrößen führt.

Neben den beschriebenen einzelnen Peptidzyklisierungen wurde von der Arbeitsgruppe Walsh ein kombinatorischer biomimetischer Ansatz entwickelt, um Bibliotheken zyklischer Peptide zu generieren (Kohli et al., 2002b). In der natürlichen Multienzym-Umgebung wird das ppan-gebundene Substrat durch das PCP an die TE-Domäne weitergereicht. Um diese Situation nachzuahmen, wurde das Carrier-Protein durch einen synthetischen Linker ersetzt, der an ein Polyethylen-Glykol-Amid-(PEGA) Harz gebunden ist. An diesem Harz wurde über Festphasensynthese eine Bibliothek von linearen Peptidylsubstraten synthetisiert. Eine anschließende Inkubation mit der rekombinanten TycC-TE führte zur effizienten Abspaltung

von zyklischen Tyrocidin-Analoga. Interessanterweise konnte unter den hergestellten Molekülen ein Kandidat identifiziert werden, der eine höhere Spezifität für bakterielle Membranen aufweist, als das natürliche Tyrocidin (Abb. 1.13). Die Sequenz dieses verbesserten Tyrocidin-Derivats kann nun möglicherweise in ein verändertes NRPS-Templat zurückübersetzt werden, um eine fermentative Produktion des verbesserten Naturstoffs zu ermöglichen.

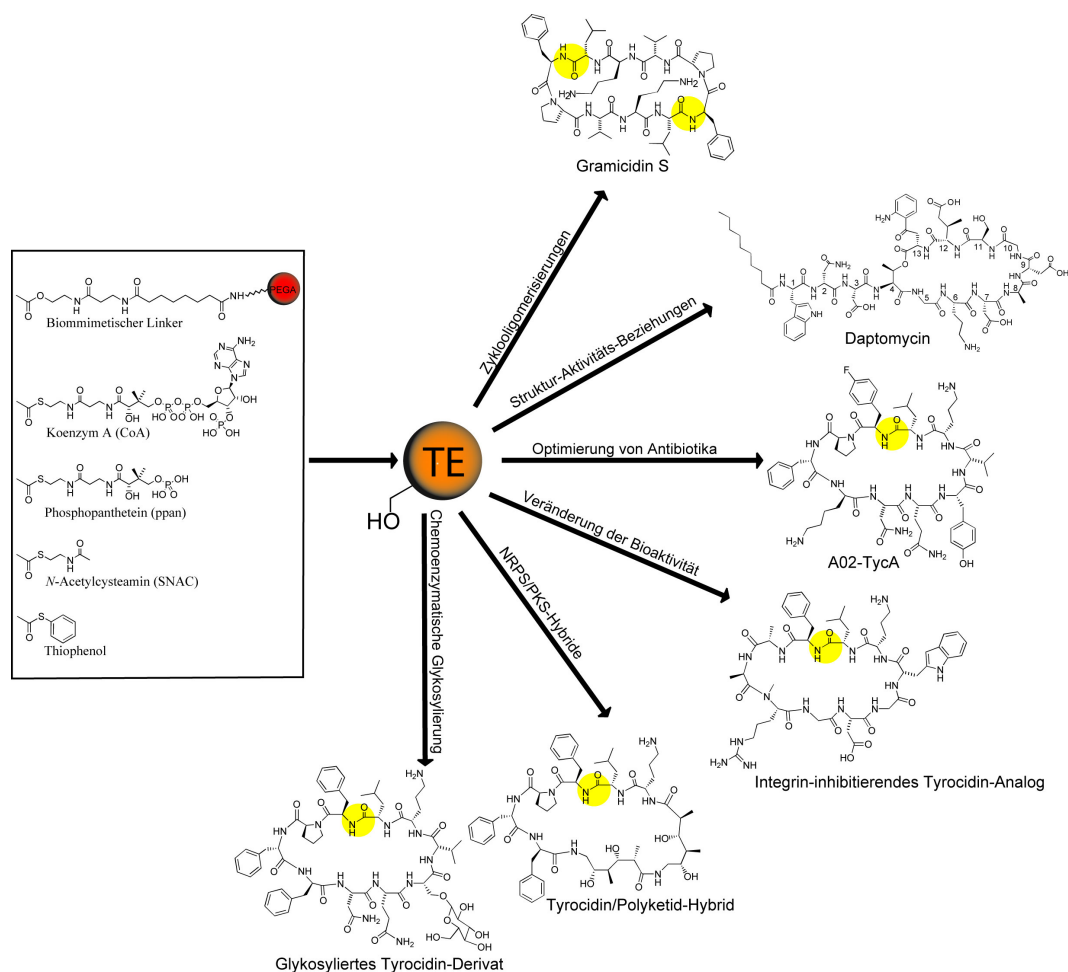


Abbildung 1.13: Verschiedene Anwendungen der Zyklase-basierten chemoenzymatischen Synthese (nach Grünewald et al., 2006).

Die Substrate werden entweder als lösliche Thioester oder gebunden an eine artifizielle Festphase (PEGA-Harz) eingesetzt.

1.6 Fragestellung dieser Arbeit

Das erste Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines SnbDE-TE-basierten chemoenzymatischen Ansatzes zur unkomplizierten Synthese von Streptogramin B-Varianten. Zu diesem Zweck wurde die SnbDE-Zyklase aus *S. pristinaespiralis* rekombinant überexprimiert und *in vitro* biochemisch charakterisiert. Insbesondere interessierten dabei die Regio- und Stereoselektivität der Zyklisierung sowie die Toleranz der Zyklase in Bezug auf die Zyklisierung von Substratanaloga, die Abweichungen von der natürlichen Streptogramin B-Aminosäuresequenz aufweisen. Diese Untersuchungen sollten zeigen, inwieweit die Aktivität der SnbDE-TE ausgenutzt werden kann, um bekannte Probleme der chemischen Streptogramin B-Synthese (siehe Abschnitt 5.2.1) zu lösen und um Varianten dieser wichtigen Antibiotikaklasse herzustellen.

Das zweite Ziel der Arbeit war die *in vitro*-Charakterisierung des Biosynthesewegs des 3-MeGlu-Restes der aziden Lipopeptide, welcher sich in den Antibiotika CDA, Daptomycin und A54145 an konservierten Ringpositionen findet und wichtig für deren Bioaktivität ist (siehe Abschnitt 1.4.2). Zu diesem Zweck wurden die putativen SAM-abhängigen Glu-Methyltransferasen GlnT aus *S. coelicolor*, DptI aus *S. roseosporus* und LptI aus *S. fradiae* rekombinant überexprimiert und biochemisch charakterisiert. Dabei stellte sich insbesondere die Frage nach dem Substrat der Methylierungsreaktion, dem genauen Zeitpunkt der Methylierung während der Biosynthese der aziden Lipopeptide und der natürlichen Strategie zur chemischen Aktivierung der relativ unreaktiven C β -Position des Glutamats.

2 Material

2.1 Geräte

Tabelle 2.1: Verwendete Geräte.

Gerät	Hersteller und Typenbezeichnung
Autoklav	<i>Tuttnauer 5075 ELV</i>
Analysewaagen	<i>Sartorius</i>
Brutschrank	<i>Köttermann 2736</i>
Clean-Bench	<i>Antair BSK</i>
DNA-Agarosegel-Dokumentation	<i>Cybertech CS1 Videokamera</i> <i>Mitsubishi Video Copy Processor</i> Thermodrucker
Elektroporationspulser	<i>Biorad Gene PulserII</i>
ESI-MS-System	<i>Hewlett Packard Series 1100</i>
FPLC-Säulen	<i>Amersham Biosciences</i> HighTrap Desalting; <i>Amersham Biosciences</i> HiLoad Superdex Gelfiltrationssäule
FPLC-System	<i>Amersham FPLC-System 250:</i> Gradienten-Programmer GP-250, Pumpen P-500 Uvicord Optische Einheit UV-1, Uvicord Kontroll Einheit UV-1 2-Kanal-Flachbettschreiber REC-102 Injektions-Ventil V-7, 3-Wege-Magnetventil PSV-100 Fraktion Sammler FRAC-100
French-Press-Zelle	<i>SLM Aminco</i> French Pressure Cell Press 5.1
Gefriertrocknungs-Anlagen	<i>Edwards</i> Freeze Dryer Super Modulyo <i>Christ</i> Alpha 2-4 LSC
HPLC-Säulen	<i>Macherey & Nagel</i> Nucleodur 250/3 C ₁₈ ec, Nucleodur C ₁₈ ec 125/2; RP-C ₈ Nucleosil 120-3, <i>Agilent</i> Zorbax Rx-C8
HPLC-System	<i>Agilent</i> series 1100 HPLC-System Vakuum-Entgaser, DAD-Detektor, Quaternäre Pumpe, Autosampler, HP-Chemstation
Luftschüttler	<i>New Brunswick Scientific</i> Series25 Incubator Shaker; <i>New Brunswick Scientific</i> Innova4300 Incubator Shaker
NMR	<i>Bruker</i> Advance AC-300
MALDI-TOF	<i>Bruker</i> FLEXIII
Peptid-Synthetisierer	<i>Advanced ChemTech</i> APEX396 Synthesizer

PCR-Maschine	<i>Eppendorf</i> Mastercycler Personal
Photometer	<i>Amersham Biosciences</i> Ultrospec3100Pro <i>PeqLab</i> NanoDrop Spectrophotometer ND1000
pH-Meter	<i>Schott</i> CG 840
Reinstwasseranlage	<i>Seral</i> Seralpur Pro90CN
Schüttelinkubator	<i>Eppendorf</i> Thermomixer Comfort
Speed-Vac	<i>Uniequip</i> Univapo 150H
Vakuumgeltrockner	<i>Fisherbrand</i> FSGD-5040
Vortexer	<i>Scientific Industries</i> Vortex Genie2
Zentrifugen	<i>Eppendorf</i> Centrifuge 5415D; <i>Heraeus</i> Biofuge Pico; <i>Sorvall</i> RC26Plus, RC5BPlus

2.2 Chemikalien, Enzyme, Laborprodukte

In Tabelle 2.2 nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen *Fluka* und *Sigma-Aldrich* in p.a. Qualität bezogen und ohne weitere Reinigung verwendet.

Tabelle 2.2: Verwendete Chemikalien, Enzyme und Laborprodukte

Hersteller	Produkt(e)
Agilent Technologies	DHB-Matrix
Amersham Biosciences	Ampicillin, Kanamycin, Hefeextrakt, IPTG, Coomassie Brilliant Blue G und R250, Agar Nr.1, verschiedene Restriktions-Endonukleasen
Bachem	N _α -Fmoc-geschützte Aminosäuren, N _α -Boc-geschützte Aminosäuren
Eurogentech	Agarose, Elektroporationsküvetten
Fluka	Verschiedene trockene Lösungsmittel, SDS, TEMED
Macherey und Nagel	C ₁₈ -Nucleodur HPLC Säulen
Millipore	Amicon Ultra (0,025 µm)

New England Biolabs	Desoxyribonukleotide (dATP, dTTP, dGTP, dCTP), verschiedene Restriktions-Endonukleasen, Protein-Marker, 1kb-DNA-Marker
Novabiochem	N _α -Fmoc-geschützte Aminosäuren, 2-Chlorotriylchlorid Harz, HBTU, HOBt, PyBOP
Nunc	Sterile 96-Well Mikrotiter-Platten (Nunclon-Surface)
Oxoid	Agar Nr.1, Trypton
Qiagen	Oligonukleotide, QIAquick-spin PCR Purification Kit, Ni ²⁺ -NTA-Agarose
Roth	Ethidiumbromid, β-Mercaptoethanol, Acrylamid für SDS-PAGE, Piperidin
Schleicher & Schüll	Sterilfilter (0,45 µm)
Sigma	EDTA, N-Acetylcysteamin
Vivascience AG	Vivaspin 20 Konzentratoren

2.3 Vektoren

2.3.1 pBAD202/D-TOPO

Das pBAD202/D-TOPO Vektorsystem (Invitrogen) wurde für die Klonierung und Expression der SmbDE-TE verwendet. Die Expression wird über einen araBAD-Promotor (P_{BAD}) reguliert und über Arabinose induziert. Eine an das durch die Expression produzierte rekombinante Protein angehängte His-patch Thioredoxin-Domäne (11.7 kDa) steigert die Translationseffizienz und verbessert die Proteinlöslichkeit. Eine Abspaltung dieser Domäne kann durch die EK (Enterokinase)-Protease erreicht werden, welche die EK Spaltungssequenz selektiv erkennt. Der Vektor ermöglicht durch eine Fusion eines C-terminalen His₆-Tags an das rekombinante Protein eine Reinigung über Ni-NTA Affinitätschromatographie.

Der Vektor enthält außerdem die folgenden Komponenten:

- Origin of Replication von pUC-Plamiden
- *rrnB* Transkriptionsterminator
- Kodonsequenz, welche ein V5 Epitop kodiert
- CAP-(cAMP-Bindeprotein) Bindungsstelle für eine Transkriptionssteigerung durch Bindung eines CAP-cAMP-Komplexes
- Kanamycinresistenz

2.3.2 pCB28(a+)

Der pCB28(a+)-Vektor ist ein derivatisierter pET28(a+)-Vektor (Novagen) und wurde in dieser Arbeit für die Klonierung und Expression von GlnT, DptI, LptI und IlvE verwendet. Der Vektor ermöglicht die Reinigung des rekombinanten Proteins über Ni-NTA-Affinitätschromatographie, indem er wahlweise einen N-terminalen His₆-Tag oder einen C-terminalen His₆-Tag an das produzierte Protein fusioniert.

Der Vektor enthält außerdem die folgenden Komponenten:

- pBR322 Origin of Replication
- T7-Promotor
- T7-Terminator
- *lac*-Operator
- *lacI*-kodierende Sequenz
- Kanamycinresistenz

2.3.3 pQTEV

Der pQTEV-Vektor ist ein derivatisierter pQE60-Vektor (Qiagen) und wurde für die Klonierung und Expression von CDAPSI-PCP10 verwendet. Der Vektor ermöglicht die Reinigung des rekombinanten Proteins über Ni-NTA-Affinitätschromatographie, indem er einen N-terminalen His₇-Tag an das produzierte Protein fusioniert. Nach der Reinigung kann der His₇-Tag durch Inkubation mit der TEV-Protease abgespalten werden. Der pQTEV-Vektor besitzt zwei *lac*-Operatoren in der Promotorregion. In Anwesenheit des *lac*-Repressors, welcher auch durch den Vektor kodiert wird, wird eine Genexpression verhindert. Nach Induktion mit IPTG wird die Repression aufgehoben, und die Genexpression findet statt.

Der Vektor enthält außerdem die folgenden Komponenten:

- Origin of Replication aus *E. coli* (ColE1)
- Synthetische ribosomale Bindungsstelle RBSII
- T5-Promotor eines *E. coli*-Phagen
- Transkriptionsterminatoren t_0 eines λ -Phagen und T1 des *rnnB*-Operons aus *E. coli*
- Kodonsequenz, welche ein V5 Epitop kodiert
- Ampicillinresistenz

2.4 Mikroorganismen

2.4.1 *Escherichia coli* XL1-Blue

Der Stamm *Escherichia Coli* XL1-Blue wurde für Klonierungsarbeiten benutzt. Er besitzt den Genotyp *recA1*, *endA11*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, *lac*, $F'(proAB^+, lacI^q, lacZDM15 Tn10 (Tet^I))$.

2.4.2 *Escherichia coli* Top 10

Bei diesem *E. coli* Stamm handelt es sich ebenfalls um einen Klonierungsstamm. Er besitzt den Genotyp $F^- mcrA$. (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) 80*lacZ*.M15.*lacX74 deoR recA1 araD139. (ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG*.

2.4.3 *Escherichia coli* BL21 (DE3)

Der *E. coli* Stamm BL21(DE3) mit dem Genotyp $F^- ompT[Ion]r_b^-m_b^-$ wurde als bakterieller Wirt für die Expression von Plasmid-DNA verwendet. Diesem Stamm fehlen die Proteasen Ion und OmpT, wodurch eine signifikante Erhöhung der Protein-Stabilität erreicht wird. Er enthält außerdem ein IPTG-induzierbares T7 RNA-Polymerase-Gen, welches im Chromosom nach *lacZ* und dem Promotor *lacV5* auf einem λ -Prophagen insertiert ist. Das ist essentiell für die Induktion der Expression von Genen, die unter Kontrolle des T7-Promotors stehen.

2.5 Medien

Für die Anzucht der verwendeten Mikroorganismen wurden ausschließlich LB-Medium verwendet. Festmedium wurde durch Zusatz von 1.2% Agar (w/v) Nr.1 vor dem Autoklavieren (121°C; 1,5 bar; 30 min) hergestellt.

LB-Medium	Bactotrypton	10 g/L
	Hefeextrakt	5 g/L
	NaCl	5 g/L

Dem Medium wurde nach Bedarf Antibiotika in den Standardkonzentrationen 100 µg/mL Ampicillin und 25 µg/mL Kanamycin zugesetzt.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Konstruktion der rekombinanten Plasmide

Alle benötigten DNA-Fragmente wurden durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) unter Verwendung von synthetischen Oligonukleotiden (Qiagen) und der Pfu Turbo DNA Polymerase (Stratagene) oder der Phusion Polymerase (Finnzymes) nach Herstellerangaben amplifiziert. Die Reinigung der Amplifikate wurde mit dem „QIAquick-spin PCR purification kit“ nach den Vorschriften des Herstellers (Qiagen) durchgeführt. Alle Konstrukte wurden durch Restriktionsverdau und DNA-Sequenzierung analysiert. Die Sequenzen der für die Herstellung der Konstrukte verwendeten PCR-Amplifikate finden sich im Anhang. Die Produktion aller rekombinanten Plasmide wurde in *E. coli* TOP 10 ausgeführt.

Konstruktion von pBAD202/D-TOPO[snbDE-TE]:

Das *snbDE-TE*-Genfragment wurde über PCR aus der chromosomalen DNA von *Streptomyces pristinaespiralis* ATCC 25486 mittels der Pfu Turbo DNA Polymerase (Stratagene) amplifiziert. Dazu wurden die synthetischen Oligonukleotide 5'-*snbDE-TE* (5'-C ACC GGC GCC GAC ACG GGC) und 3'-*snbDE-TE* (5'-GTG GCC GGC CTG CGG) verwendet. Die PCR-Produkte wurden unter Verwendung des „pBAD directional TOPO expression kit“ (Invitrogen) nach Herstellerangaben direkt in den pBAD202/D-TOPO-Vektor (Invitrogen) kloniert. Dieser Vektor hängt eine N-terminale His-patch Thioredoxin-Domäne und einen C-terminalen His₆-Tag an das exprimierte Protein an.

Konstruktion von pCB28(a+)[glmT]:

Das *glmT*-Genfragment wurde über PCR aus der chromosomalen DNA von *Streptomyces coelicolor* A3(2) (DSM 40783) mittels der Phusion Polymerase (Finnzymes) amplifiziert. Dazu wurden die synthetischen Oligonukleotide 5'-*glmT* (5'-AAA AAA CCA TGG TGA CCG GGG ACG ACG TGC AGG GG) und 3'-*glmT* (5'-AAA AAA AAG CTT TGC CGC CTT CCC GGC GGT GGC CG) verwendet. Nach Reinigung und Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *HindIII* wurde das Genfragment in die korrespondierenden Restriktionstellen des pCB28(a+)-Vektors, welcher ein derivatisierter pET28(a+)-Vektor (Novagen) ist, ligiert. Dieser Vektor fügt unter Verwendung der

beschriebenen Klonierungsstrategie einen C-terminalen His₆-Tag an das exprimierte Protein an.

Konstruktion von pCB28(a+)[dptI]:

Das *dptI*-Genfragment wurde über PCR aus der chromosomalen DNA von *Streptomyces roseosporus* (NRLL 11379) mittels der Phusion Polymerase (Finnzymes) amplifiziert. Dazu wurden die synthetischen Oligonukleotide 5'-*dptI* (5'-AAA AAA CCA TGG TGA CCG GCG AAA CCC GCA CCA C) und 3'-*dptI* (5'-AAA AAA AAG CTT TGG TTT GCG TCC GTG GGC GAC GA) verwendet. Nach Reinigung und Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *HindIII* wurde das Genfragment in die korrespondierenden Restriktionstellen des pCB28(a+)-Vektors ligiert. Dieser Vektor fügt unter Verwendung der beschriebenen Klonierungsstrategie einen C-terminalen His₆-Tag an das exprimierte Protein an.

Konstruktion von pCB28(a+)[lptI]:

Das *lptI*-Genfragment wurde über PCR aus der chromosomalen DNA von *Streptomyces fradiae* (NRLL 18158) mittels der Phusion Polymerase (Finnzymes) amplifiziert. Dazu wurden die synthetischen Oligonukleotide 5'-*lptI* (5'-AAA AAA GGA TCC ATG CAG GCG GAT GCA CCG GCG G) und 3'-*lptI* (5'-AAA AAA AAG CTT TCA GGT GGG TGG CTT GTG GGA GAC GG) verwendet. Nach Reinigung und Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *HindIII* wurde das Genfragment in die korrespondierenden Restriktionstellen des pCB28(a+)-Vektors ligiert. Dieser Vektor fügt unter Verwendung der beschriebenen Klonierungsstrategie einen N-terminalen His₆-Tag an das exprimierte Protein an.

Konstruktion von pCB28(a+)[ilvE]:

Das *ilvE*-Genfragment wurde über PCR aus der chromosomalen DNA von *Streptomyces coelicolor* A3(2) (DSM 40783) mittels der Phusion Polymerase (Finnzymes) amplifiziert. Dazu wurden die synthetischen Oligonukleotide 5'-*ilvE* (5'-AAA AAA GGA TCC ATG ACG ACG CCC ACG ATC GAG CTC) und 3'-*ilvE* (5'-AAA AAA AAG CTT TCA GGC CAG CGT GTG CAT CCA CC) verwendet. Nach Reinigung und Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *BamHI* und *HindIII* wurde das Genfragment in die korrespondierenden Restriktionstellen des pCB28(a+)-Vektors ligiert. Dieser Vektor fügt

unter Verwendung der beschriebenen Klonierungsstrategie einen N-terminalen His₆-Tag an das exprimierte Protein an.

Konstruktion von pQTEV[cdaPSIII-PCP10]:

Das *cdaPSIII-PCP10*-Genfragment wurde über PCR aus der chromosomalen DNA von *Streptomyces coelicolor* A3(2) (DSM 40783) mittels der Phusion Polymerase (Finnzymes) amplifiziert. Dazu wurden die synthetischen Oligonukleotide 5'-*cdaPSIII-PCP10* (5'- AAA AAA GGA TCC CGG ACC GCG GGC CGG G) und 3'-*cdaPSIII-PCP10* (5'- AAA AAA GCGG CCGC CGC CCC GGC GAG CAC CAC) verwendet. Nach Reinigung und Restriktionsverdau mit den Restriktionsendonukleasen *NcoI* und *NotI* wurde das Genfragment in die korrespondierenden Restriktionstellen des pQTEV-Vektors, eines derivatisierten pQE-30-Vektors (Qiagen) ligiert. Dieser Vektor fügt unter Verwendung der beschriebenen Klonierungsstrategie einen N-terminalen His₇-Tag an das exprimierte Protein an.

3.1.2 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung aller beschriebenen Konstrukte wurde durch die Firma GATC-Biotech (Konstanz) ausgeführt. Die Analyse aller Konstrukte ergab eine fehlerfreie Klonierung.

3.2 Proteinchemische Methoden

Die in dieser Arbeit verwendeten Standardtechniken der Proteinanalytik (SDS-PAGE und Coomassie-Färbung der SDS-Gele) wurden nach Laemmli (Laemmli, 1970) und Bennett (Bennett und Scott, 1971) durchgeführt und werden hier nicht weiter beschrieben.

3.2.1 Genexpression

Die Produktion der jeweiligen rekombinanten Proteine wurde unter Verwendung der Expressionsvektorsysteme pCB28(a+) und pQTEV ausgeführt. Zur Herstellung der Expressionsstämme wurden *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen mit den jeweiligen Expressionsplasmiden transformiert.

3.2.1.1 Expression unter Verwendung des pBAD202/D-TOPO-Vektors

2 L LB-Medium (Kan⁵⁰) wurden mit 20 mL einer Übernachtskultur des jeweiligen Expressionstamms in LB-Medium (Kan⁵⁰) angeimpft. Die Zellen wurden in einem Luftschüttler bei 250 rpm und 30 °C inkubiert, bis die Kultur eine OD₆₀₀ von 0.5 erreichte. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von Arabinose bis zu einer Endkonzentration von 0.01%. Die Kultur wurde bei 25 °C für weitere 2.5 Stunden geschüttelt und anschließend durch Zentrifugation pelletiert (7000 rpm, 4 °C, 15 min). Das entstandene Pellet wurde in Hepes A-Puffer (50 mM Hepes, 300 mM NaCl, pH 8.0) resuspendiert, und die erhaltene Suspension bei -20 °C gelagert.

3.2.1.2 Expression unter Verwendung des pQTEV-Vektors

2 L LB-Medium (Amp¹⁰⁰) wurden mit 20 mL einer Übernachtskultur des jeweiligen Expressionstamms in LB-Medium (Amp¹⁰⁰) angeimpft. Die Zellen wurden in einem Luftschüttler bei 250 rpm und 30 °C inkubiert, bis die Kultur eine OD₆₀₀ von 0.5 erreichte. Die Induktion der Expression erfolgte durch Zugabe von Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) bis zu einer Endkonzentration von 1 mM. Die Kultur wurde bei 25 °C für weitere 3 Stunden geschüttelt und anschließend durch Zentrifugation pelletiert (7000 rpm, 4 °C, 15 min). Das entstandene Pellet wurde in Hepes A-Puffer resuspendiert, und die erhaltene Suspension bei -20 °C gelagert.

3.2.1.3 Expression unter Verwendung des pCB28(a+)-Vektors

5 L LB-Medium (Kan⁵⁰) wurden mit 50 mL einer Übernachtskultur des jeweiligen Expressionstamms in LB-Medium (Kan⁵⁰) angeimpft. Für die Produktion von GlmT, DptI und LptI wurden die Zellen bei 250 rpm und 20 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 inkubiert, die Expression wurde durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 0.1 mM induziert, und die Kultur wurde bei 20 °C für weitere 18 Stunden geschüttelt. Für die Produktion von IlvE wurden die Zellen bei 250 rpm und 30 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 inkubiert, die Expression wurde durch Zugabe von IPTG bis zu einer Endkonzentration von 1 mM induziert, und die Kultur wurde bei 25 °C für weitere 3 Stunden geschüttelt. Nach erfolgter Expression wurden die Kulturen durch Zentrifugation pelletiert (7000 rpm, 4 °C, 15 min). Das entstandene Pellet wurde in Hepes A-Puffer resuspendiert, und die erhaltene Suspension bei -20 °C gelagert.

3.2.2 Proteinreinigung

3.2.2.1 Zellaufschluss

Die in Hepes-A-Puffer resuspendierten Zellen wurden unter Eiskühlung durch zweimaliges Durchlaufen einer French-Press-Zelle (*SLM Aminco*) aufgeschlossen. Die Zelltrümer und unlöslichen Bestandteile wurden durch einen Zentrifugationsschritt (17000 rpm, 4°C, 30 min) abgetrennt, und der klare Überstand des Zentrifugats für die Affinitätschromatographie verwendet.

3.2.2.2 Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

Die rekombinaten His-getagten Proteine wurden über Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie an einer FPLC-Anlage (Amersham Biosciences) gereinigt. In Standard-Reinigungen wurden Zellextrakte von Expressionen im 2L-Maßstab oder im 5L-Maßstab auf eine mit Ni²⁺-NTA Superflow (Qiagen) befüllte Säule (HR 10/2, Amersham Biosciences) geladen. Die Säule wurde mit einer Flussrate von 0.7 mL/min mit 3% Hepes B (50 mM Hepes, 300 mM NaCl, 250 mM Imidazol, pH 8.0) in Hepes A (50 mM Hepes, 300 mM NaCl, pH 8.0) beladen und gewaschen. Der Waschvorgang wurde durch Messung der Absorption bei 280 nm in einer Durchflusszelle verfolgt und fortgesetzt, bis die Absorption wieder ihren Wert vor Beginn der Beladung erreichte. Anschließend wurde zu Elution der His-getagten Proteine bei einer Flussrate von 1 mL/min ein 30 minütiger linearer Gradient von 3% bis 45% Hepes B in Hepes A angelegt, dem ein 10 minütiger linearer Gradient bis 100% Hepes B folgte. Das Eluat wurde in Fraktionen von 2 mL Fraktionsgröße gesammelt. Fraktionen, die Protein enthielten, wurden über den Bradford-Test (Bradford, 1976) identifiziert und über SDS-PAGE analysiert. Die Fraktionen, die das gewünschte Protein enthielten, wurden vereinigt und mittels HiTrap-Desalting-Säulen (Amersham Biosciences) auf Dialysepuffer (25 mM Hepes, 50 mM NaCl, pH 7.0) umgepuffert. Nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff wurden die Proteine bei -80 °C gelagert.

3.2.2.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration der gereinigten Enzyme wurde photometrisch (280 nm) unter Berücksichtigung des berechneten Extinktionskoeffizienten ermittelt (Tabelle 3.1). Die theoretischen Extinktionskoeffizienten wurden unter Verwendung des Programmes Protean (DNASar) berechnet.

Tabelle 3.1: Theoretische Extinktionskoeffizienten ($\lambda = 280$ nm).

Protein (Vektorsystem)	Theoretischer Extinktionskoeffizient [mg/mL]
SnbDE-TE (pBAD202/D-Topo)	1.14
GlmT (pCB28(a+))	0.93
DptI (pCB28(a+))	1.35
LptI (pCB28(a+))	1.27
IlvE (pCB28(a+))	0.68
CDAPSI-PCP10 (pQTEV)	3.24

3.3 Biochemische Methoden

3.3.1 SnbDE-TE-vermittelte Peptidzyklisierung

Die SnbDE-TE-vermittelten Zyklisierungsreaktionen von Peptidyl-SNAC-Substraten wurden in Dialysepuffer (25 mM Hepes, 25 mM NaCl, pH 7.0) bei 25 °C in einem Gesamtvolumen von 50 µL ausgeführt. Die Löslichkeit der Substrate **21**, **22** und **23** wurde durch die Zugabe von 5% DMSO (v/v) erleichtert. In Standardreaktionen betrug die Substratkonzentration 250 µM und die Enzymkonzentration 5 µM. Für die Bestimmung der kinetischen Parameter wurde die Substratkonzentration zwischen 25 µM und 3 mM variiert. Die Reaktionen wurden in diesen Studien durch Enzymzugabe zu einer Endkonzentration von 10 µM gestartet. Das Abstoppen der Reaktionen geschah durch Zugabe von 35 µL 4%iger Trifluoressigsäure (TFA)/H₂O. Alle Assays wurden über reversed-phase HPLC-MS mittels eines ESI-Quad 1100(A)-Series MSD-Massenspektrometers (Agilent) auf einer C₁₈ Nucleodur Säule (Macherey and Nagel, 250/3, pore diameter 100 Å, particle size 3 µm) mit den folgenden Gradienten durchgeführt: Substrate **1-21**, 0-40 min, 10-60% Acetonitril/0.1% TFA (v/v) in Wasser/0.1% TFA (v/v), 0.3 mL/min, 40 °C; Substrate **22-23**, 0-40 min, 35-90% Acetonitril/0.1% TFA (v/v) in Wasser/0.1% TFA (v/v), 0.3 mL/min, 40 °C. Die Identitäten aller Substrate und Produkte wurden durch ESI-MS verifiziert (Tabelle 3.2).

Die Konzentrationen der Peptidylthioester wurden durch experimentell bestimmte Extinktionskoeffizienten bei einer Wellenlänge von 215 nm kalkuliert. Dabei wurde angenommen, dass die Extinktionskoeffizienten der Peptidyl-SNAC-Substrate mit denen der hydrolysierten und zyklisierten Produkte identisch sind. Die kinetische Charakterisierung der Zyklisierungs- und Hydrolysereaktionen wurde durch Bestimmung der Anfangsreaktionsgeschwindigkeitsraten bei 5 bis 8 Substratkonzentrationen unter Verwendung von zwei Zeitpunkten innerhalb des linearen Bereichs des Reaktionsverlaufs vorgenommen. Die Berechnung der kinetischen Parameter erfolgte über das Programm SigmaPlot (Enzyme Kinetics Modul).

Die Substrate **21-23** zeigen nur eine geringe Wasserlöslichkeit und wurden nach ihrer Reinigung in DMSO gelöst. Dadurch kommt in Standardassays die oben genannte DMSO-Konzentration von 5% (v/v) zustande. Es wurde beobachtet, dass DMSO die Enzymreaktion ab Konzentrationen von höher als 20% inhibiert. Daher konnten für diese drei Substrate die Anfangsreaktionsgeschwindigkeiten nur bis zu Substratkonzentrationen von 500 µM bestimmt werden. Aus diesem Grund war mit diesen Substraten eine separate Bestimmung von k_{cat} und

K_M nicht möglich. Stattdessen wurde für diese Substrate der k_{cat}/K_M aus der Anfangssteigung des Michaelis-Menten-Plots extrapoliert.

Tabelle 3.2: Charakterisierung von Substraten und Produkten der Zyklisierungsassays durch ESI-MS.

Verbindung*	Spezies	Beobachtete Masse (Kalkulierte Masse) (Da) ¹		
		Substrat	Zyklus	Hydrolysat
1	[M+H] ⁺	944.4 (944.4)	825.4 (825.4)	843.4 (843.4)
2	[M+H] ⁺	930.4 (930.4)	811.3 (811.4)	829.3 (829.4)
3	[M+H] ⁺	898.3 (898.4)	-	797.3 (797.4)
4	[M+H] ⁺	899.3 (899.4)	-	798.3 (798.4)
5	[M+H] ⁺	944.4 (944.4)	825.4 (825.4)	843.4 (843.4)
6	[M+H] ⁺	944.4 (944.4)	825.4 (825.4)	843.4 (843.4)
7	[M+H] ⁺	944.4 (944.4)	825.4 (825.4)	843.4 (843.4)
8	[M+H] ⁺	936.3 (936.5)	-	835.3 (835.4)
9	[M+H] ⁺	930.3 (930.4)	811.3 (811.4)	829.3 (829.4)
10	[M+H] ⁺	918.3 (918.4)	799.3 (799.4)	817.3 (817.4)
11	[M+H] ⁺	853.3 (853.4)	734.3 (734.3)	752.3 (752.4)
12	[M+H] ⁺	904.3 (904.4)	785.3 (785.4)	803.3 (803.4)
13	[M+H] ⁺	868.3 (868.4)	749.3 (749.4)	767.3 (767.4)
14	[M+H] ⁺	928.3 (928.4)	809.3 (809.4)	827.3 (827.4)
15	[M+H] ⁺	943.3 (943.4)	824.3 (824.4)	842.3 (842.4)
16	[M+H] ⁺	927.3 (927.4)	808.3 (808.4)	826.3 (826.4)
17	[M+H] ⁺	1015.5 (1015.5)	896.3 (896.4)	914.4 (914.4)
18	[M+H] ⁺	859.3 (859.4)	740.3 (740.3)	758.3 (758.4)
19	[M+H] ⁺	930.3 (930.4)	811.3 (811.4)	829.3 (829.4)
20	[M+H] ⁺	914.3 (914.4)	795.3 (795.4)	813.3 (813.4)
21	[M+H] ⁺	972.5 (972.5)	853.4 (853.4)	871.4 (871.4)
22	[M+Na] ⁺	965.5 (965.4)	846.3 (846.4)	864.3 (864.4)
23	[M+H] ⁺	929.3 (929.4)	810.4 (810.4)	828.4 (828.4)

* Zur Identität der Verbindungen siehe Tabelle 4.10.

3.3.2 Genereller GlmT-, DptI- und LptI-vermittelter Methylierungsassay

Die rekombinante Methyltransferase (GlmT, DptI oder LptI) (5 μ M) wurde für 15 h bei 25 °C mit verschiedenen Substraten (250 μ M) und dem Methylgruppendonor *S*-Adenosyl-Methionin (SAM) (500 μ M) in 50 μ L Dialysepuffer (25 mM Hepes, 50 mM NaCl, pH 7.0) inkubiert. In allen Fällen wurden Kontrollreaktionen ohne Methyltransferase oder ohne SAM durchgeführt.

3.3.3 Methylierungsassay mit Glu-S-PCP

Rekombinantes CDAPSI-PCP10 (50 μ M) wurde mit synthetischem Glu-CoA-Thioester (2 mM) und der 4'-Phosphopantethein-Transferase Sfp (40 μ M) für 30 min bei 25 °C inkubiert. Die Synthese des Glu-S-PCP-Thioesters wurde durchgeführt, wie von Stein et al. beschrieben (Stein et al., 2005). Nach erfolgter Inkubation wurde das Glu-S-PCP-Produkt mit den Methyltransferasen wie unter 3.3.2 beschrieben inkubiert. Die Analyse der Assays wurde unter Verwendung von hochauflösender Massenspektrometrie unter Verwendung einer API Qstar Pulsar I device (Applied Biosystems) ausgeführt.

3.3.4 Methylierungsassay mit einem CDA-Analogon

Ein nichtmethyliertes CDA-Analogon wurde nach einer Vorschrift von Grünewald et al. (Grünewald et al., 2004b) chemoenzymatisch synthetisiert und mit den Methyltransferasen und SAM wie in Abschnitt 3.3.2 beschrieben inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 50 μ L einer 4%igen TFA-Lösung abgestoppt und mittels reversed-phase HPLC-MS mittels eines ESI-Quad 1100(A)-Series MSD-Massenspektrometers (Agilent) auf einer C₁₈ Nucleodur Säule (Macherey and Nagel, 250/3, pore diameter 100 Å, particle size 3 μ m) mit den folgenden Gradienten analysiert: 0-40 min, 15-60% Acetonitril/0.1% TFA (v/v) in Wasser/0.1% TFA (v/v), 0.3 mL/min, 45 °C.

3.3.5 Methylierungsassay mit freien α -Ketosäuren oder Aminosäuren

Freie Aminosäuren oder freie α -Ketosäuren wurden mit den Methyltransferasen und SAM wie unter 3.3.2 beschrieben inkubiert. Die Reaktionen wurden durch die Zugabe von Methanol (50 μ L) abgestoppt. Die Reaktionsprodukte wurden über reversed-phase HPLC-MS mittels eines ESI-Quad 1100(A)-Series MSD-Massenspektrometers (Agilent) auf einer C₁₈ Nucleodur Säule (Macherey and Nagel, 250/3, pore diameter 100 Å, particle size 3 μ m) mit den folgenden Gradienten analysiert: 0-15 min, Wasser/2 mM Triethylamin, 0.3 mL/min, 45 °C. Um die Effizienz der Massendetektion zu erhöhen, wurde das Massenspektrometer im single ion mode verwendet, in dem ausschließlich nach den Massen der Substrate und der erwarteten Produkte gescreent wird. Die Quantifizierung der Substrate und Produkte wurde

über Integration der massenextrahierten Signale des Massenspektrometers vorgenommen, was möglich war, da α KG und 3-Methyl-2-Oxoglutarat ähnliche Ionisierungseffizienzen aufweisen. Die kinetischen Parameter k_{cat} und K_{M} wurden durch Variation der Substratkonzentration zwischen 10 μM und 2 mM und Abstoppen der Reaktionen zu geeigneten Zeitpunkten bestimmt.

3.3.6 Transaminierungsassay mit kommerziellen Transaminasen

Die folgenden fünf kommerziell erhältlichen Transaminasen (Sigma) wurden auf ihre Fähigkeit getestet, synthetisches razemisches 3-Methyl-2-Oxoglutarat zur korrespondierenden Aminosäure zu transaminieren: Die Glutamat-Pyruvat-Transaminase aus Schweineherz (Bestellnummer G-8255), die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase Typ I aus Schweineherz (Bestellnummer G-2751), die Glutamat-Oxalacetat-Transaminase Typ II-A aus Schweineherz (Bestellnummer G-7005), die Broad-Range Transaminase aus bakterieller Quelle (Bestellnummer T-7684) und die verzweigtkettige-Aminosäure Transaminase aus bakterieller Quelle (Bestellnummer B-2549). Die Transaminasen (0.005 U/ μL) wurden mit synthetischem razemischem 3-Methyl-2-Oxoglutarat (Synthese wurde beschrieben und durchgeführt von Milne et al (Milne et al., 2006)) (1 mM), der zur jeweiligen Transaminase gehörenden Donor-Aminosäure (10 mM) (Ala für die Glutamat-Pyruvat-Transaminase, Asp für die Glutamat-Oxalacetat-Transaminasen und die Broad-Range Transaminase, Val für die verzweigtkettige Aminosäure Transaminase) und Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP) (1.5 mM) in einem Gesamtvolumen von 50 μL inkubiert. Um einen quantitativeren Umsatz zu erhalten, wurden kommerzielle Dehydrogenasen (Sigma) (2×10^{-5} U/ μL) (L-Laktat-Dehydrogenase für Assays mit der Glutamat-Pyruvat-Transaminase, Malat-Dehydrogenase für Assays mit den Glutamat-Oxalacetat-Transaminasen und der Broad-Range Transaminase) und NADH (1.5 mM) nach den Angaben der Transaminierungsprotokolle der Hersteller hinzugefügt. Diese Dehydrogenasen setzen die Nebenprodukte Pyruvat und Oxalacetat der Transaminierungsreaktionen zu L-Laktat und L-Malat um und ziehen dadurch das Transaminierungsgleichgewicht auf die Produktseite. Die Puffer und Temperaturen wurden nach Herstellerangaben der Transaminasen gewählt. Die Reaktionsmischungen wurden über Nacht inkubiert. Nachdem die Reaktionen durch Zugabe von Methanol (50 μL) abgestoppt worden waren, wurden die erhaltenen Proben über reversed-phase HPLC-MS unter denselben Bedingungen wie unter 3.3.5 beschrieben analysiert.

3.3.7 Transaminierungsassay mit IlvE aus *Streptomyces coelicolor*

Rekombinantes IlvE aus *Streptomyces coelicolor* (5 μ M) wurde mit synthetischem reazemischem 3-Methyl-2-Oxoglutarat (1 mM) und L-Val (10 mM) in einem Gesamtvolumen von 50 μ L in Transaminierungspuffer (50 mM Hepes, pH 7.5) inkubiert. Die Reaktionen wurden auf dieselbe Art und Weise wie unter 3.3.6 beschrieben abgestoppt und analysiert. Die Analyse der Assays zeigte, dass eine Zugabe von PLP nicht nötig war. Die Quantifizierung von Produkten und Substraten wurde wie in Abschnitt 3.3.5 beschrieben über Integration der massenextrahierten Signale des Massenspektrometers vorgenommen. Da die α -Ketosäuren (α -KG und 3-Methyl-2-Oxoglutarat) und die Aminosäuren (Glu und 3-MeGlu) unterschiedliche Ionisierungseffizienzen haben, musste hier zunächst experimentell ein Korrekturfaktor bestimmt werden. Dazu wurden 10 unterschiedliche äquimolare Gemische von 0.1 mM Glu/ 0.1 mM α KG bis 1 mM Glu / 1mM α KG über HPLC-MS analysiert und die jeweiligen Massensignale verglichen. Dabei wurde eine Doppelbestimmung vorgenommen. Es ergab sich im Mittel für die α -Ketosäuren ein 2.3-fach höheres Massensignal, was eine 2.3-fach höhere Ionisierungseffizienz bedeutet. Bei den kinetischen Untersuchungen der Transaminierungsreaktionen und bei den Ausbeutebestimmungen wurde dieser Korrekturfaktor berücksichtigt.

3.3.8 Gekoppelter Methylierungs-Transaminierungs-Assay

Zunächst wurde α -Ketoglutarat wie unter 3.3.5 beschrieben über Nacht methyliert. In dieser Zeit läuft die Methylierung zum Produkt 3-Methyl-2-Oxoglutarat quantitativ ab. Der Assay wurde durch Zugabe des gleichen Volumens Methanol abgestoppt. Die Reaktionsmischung wurde für 30 min bei -20 °C gelagert, um die Methyltransferase auszufällen. Anschließend wurde der Niederschlag abzentrifugiert (13000 rpm, 4 °C, 15 min). Der Überstand wurde vom Pellet entfernt und über Nacht lyophilisiert. Der verbleibende Feststoff wurde in Transaminierungspuffer (50 mM Hepes, pH 7.5) zu einer theoretischen Konzentration von 5 mM 3-Methyl-2-Oxoglutarat gelöst. Die wirkliche Konzentration wurde über HPLC-MS-Analyse ermittelt. Die erhaltene Lösung von 3-Methyl-2-Oxoglutarat wurde als Stocklösung für nachfolgende Transaminierungsassays verwendet. In diesen Assays wurde enzymatisch hergestelltes 3-Methyl-2-Oxoglutarat (250 μ M) mit Val (2 mM) und der rekombinanten Transaminase IlvE aus *Streptomyces coelicolor* (8 μ M) im Transaminierungspuffer bei 25 °C in einem Gesamtvolumen von 50 μ L für 30 min inkubiert, um eine näherungsweise vollständige Transaminierung zu 3-Methyl-Glutamat (3-MeGlu) zu erhalten. Eine kinetische Charakterisierung der Transaminierung wurde durch Variation der Substratkonzentration

zwischen 10 μM und 1 mM und durch Abstoppen der Reaktionen durch Methanolzugabe zu geeigneten Zeitpunkten vorgenommen. Die Analyse der Reaktionen wurde nach einer Dabsyl-Derivatisierung (siehe 3.3.9) über reversed-phase HPLC-MS-Analyse vorgenommen. Die Dabsyl-Aminosäuren wurden über ihre Absorption bei 436 nm und durch Massenspektrometrie im single ion mode detektiert. Die HPLC-Analyse geschah auf einer C_{18} Nucleodur Säule (Macherey und Nagel, 250/3, pore diameter 100 Å, particle size 3 μm) unter Verwendung der folgenden Gradienten: 0-15 min, 7-30% Acetonitril/2mM Triethylamin in Wasser/2 mM Triethylamin, 0.2 mL/min, 45 °C.

3.3.9 Konfigurationsanalyse des enzymatisch synthetisierten 3-MeGlu

Die Dabsyl-Derivatisierung von enzymatisch hergestelltem und von organisch-synthetischem 3-MeGlu wurde nach Literaturvorschriften durchgeführt (Kim und Kim, 2001; Milne et al., 2006; Vendrell und Aviles, 1986): Der lyophilisierte gekoppelte Assay oder synthetisches 3-MeGlu (Konzentrationen zwischen 10 μM und 1 mM) wurde in wässriger NaHCO_3 (0.15 M, pH 9.0) in einem Volumen von 400 μL gelöst. Zu dieser Lösung wurden 400 μL in Aceton gelöstes Dabsylchlorid (15mM) hinzugegeben. Die Mischung wurde für 20 min auf 70 °C erhitzt und mit Ethanol auf ein Gesamtvolumen von 2 mL verdünnt. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 5 min) wurde der Überstand über reversed-phase HPLC-MS mittels eines Micromass LCT orthogonal acceleration time-of-flight-Massenspektrometers, welches mit einer ESI-Quelle kombiniert mit einem Waters 2790 Separationsmodul ausgestattet war, im Positiv-Modus (scannend von 100 bis 1000 m/z) analysiert. Die HPLC-Analyse geschah auf einer C_{18} Säule (Phenomenex, 150x4.6 mm, particle size 3 μm) unter Verwendung der folgenden Gradienten: 0-10 min, 20-70% Acetonitril/1% Wasser/0.1% Ameisensäure in Wasser/ 1% Acetonitril/0.1% Ameisensäure, 1 mL/min; 10-11 min, 70-100% Acetonitril/1% Wasser/0.1% Ameisensäure in Wasser/ 1% Acetonitril/0.1% Ameisensäure, 1 mL/min; 11-15 min, 100 % Acetonitril/1% Wasser/0.1% Ameisensäure, 1 mL/min.

3.4 Festphasen-Peptidsynthese (SPPS)

Als Festphasen-Peptidsynthese bezeichnet man einen Prozess, bei dem ein Peptid an einer festen Phase durch sukzessive Kupplung von geschützten Aminosäuren in der Reihenfolge der Peptidsequenz aufgebaut wird. Die wachsende Peptidkette ist dabei über ihren C-Terminus an die unlösliche feste Phase gebunden und ermöglicht die Entfernung von überschüssigen Reagenzien und Nebenprodukten durch einfaches Filtrieren. Die in dieser

Arbeit hergestellten Peptide wurden ausschließlich durch Fmoc-basierte Festphasensynthese im *batch*-Verfahren an einem vollautomatischen Peptidsynthesizer (Apex 396 Synthesizer, *Advanced ChemTech*) hergestellt. Als Festphase diente ein quervernetztes Polystyren-Harz, das kovalent mit einem 2-Chlorotritylchlorid-Linker verknüpft war, was die Abspaltung der orthogonal geschützten Peptide unter sehr milden sauren Bedingungen erlaubte. Die Maskierung der Aminosäureseitenfunktionalitäten wurde durch säurelabile Schutzgruppen sichergestellt [Tert-Butyl (tBu), Trityl (Trt) und Tert-Butyloxycarbonyl (Boc)].

3.4.1 Die Initiation der Peptidsynthese

Die Beladung des 2-Chlorotritylchlorid-Harzes geschah durch Umsetzung mit dem Triethylammonium-Salz der gewünschten Fmoc-geschützten Aminosäure. Dadurch wurde eine mögliche Razemisierung minimiert. Die Quantität des Beladungsschritts ist sehr wichtig, da seine Ausbeute die Gesamtproduktausbeute bestimmt. Um die effiziente Beladung des Harzes zu sichern, wurde dieses 30 min in trockenem DCM gequollen und anschließend mit 2 Äquivalenten der gewünschten Fmoc-geschützten Aminosäure und 8 Äquivalenten *N,N*-Diisopropyl-ethylamin (DIPEA) umgesetzt. Diese sterisch gehinderte Base ermöglicht die vollständige Deprotonierung der Carboxylgruppe der eingesetzten Aminosäure. Die deprotonierte Carboxyl-Gruppe greift nun die Kohlenstoff-Chlor-Bindung des 2-Chlorotritylchlorid-Harzes nukleophil an. Dadurch wird die erste Aminosäure unter Austritt eines Chlorid-Ions am Harz verankert (siehe Abb. 3.1) Der Ansatz wurde 2 h gerührt, das Lösungsmittel abfiltriert, das Harz mehrere Male mit trockenem DCM gewaschen. Die unreaktierten Stellen des Harzes wurden durch Umsetzung mit Methanol abgesättigt, um den Aufbau von verkürzten Peptidfragmenten zu verhindern.

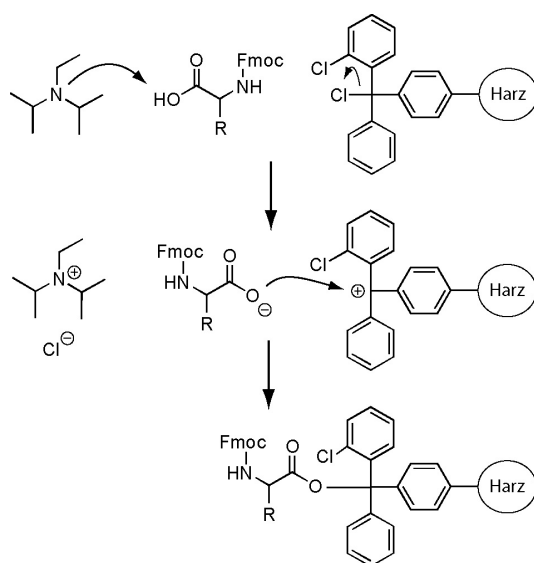


Abbildung 3.1: Beladung des 2-Chlorotritylchlorid-Harzes mit der ersten Aminosäure.

3.4.2 Elongation der Peptidketten

Um die Elongation der harzgebundenen Peptidkette um eine Aminosäure zu gewährleisten, ist eine Entschützung der N-terminalen Fmoc-Schutzgruppe erforderlich. In dieser Arbeit wurde dies über eine baseninduzierte Eliminierung durch 20 minütige Behandlung mit 15% Piperidin in DMF erreicht. Der Schlüsselschritt dieser Reaktion ist die Deprotonierung des Fluorenyl-Rings, wodurch das resonanzstabilisierte Fluorenyl-Carbanion entsteht. Letztendlich spalten sich dadurch Dibenzofulven und Kohlendioxid ab, und eine N-terminal entschützte Peptidkette verbleibt am Harz (Abb. 3.2).

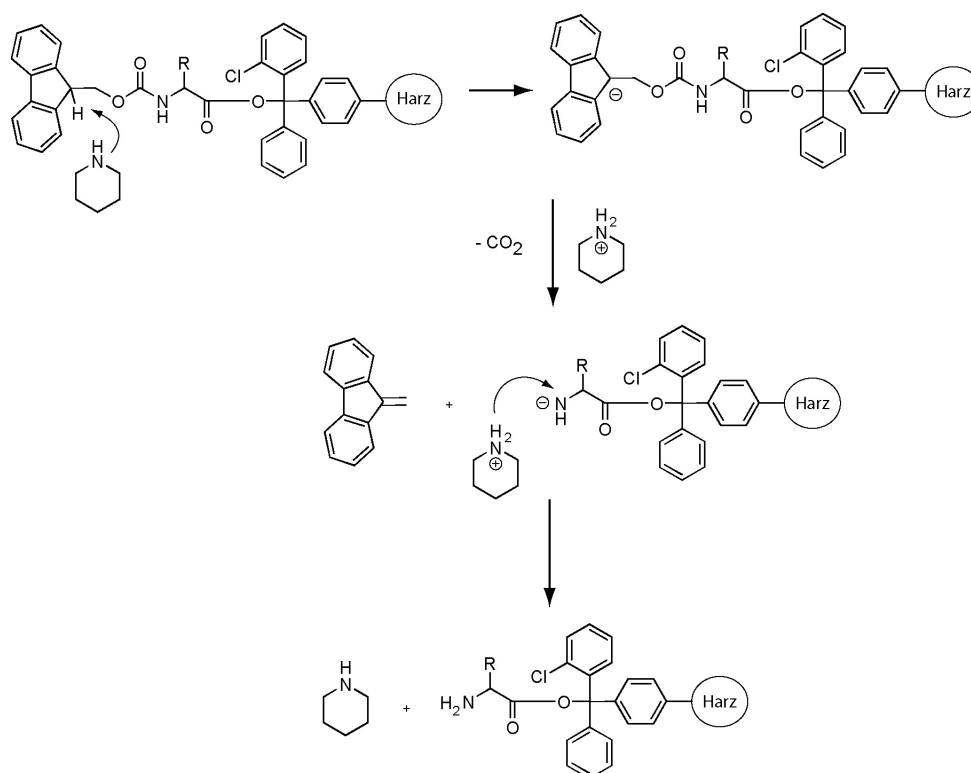


Abbildung 3.2: Entschützung der N-terminalen Fmoc-geschützten Aminosäure.

Chemische Ansätze zur Ausbildung einer Peptidbindung zwischen dem freien N-Terminus des immobilisierten Peptids und der Carboxylgruppe einer freien am N-Terminus Fmoc-geschützten Aminosäure erfordern eine Aktivierung der Carboxylgruppe der Aminosäure. In dieser Arbeit wurde die Aktivierungsreaktion *in situ* durchgeführt, d.h. die aktivierte Spezies wird während der Peptidknüpfung intermediär gebildet. Dies gelingt durch den Einsatz des Kupplungsreagenzes *O*-Benzotriazol-*N,N,N',N'*-Tetramethyluronium-hexafluorophosphat (HBTU) mit dem Additiv *N*-Hydroxybenzotriazol (HOBt). Die Carboxylgruppe der Aminosäure wird zuerst durch einen 10-fachen Überschuss DIPEA quantitativ deprotoniert. Daraufhin greift das gebildete Nukleophil das elektrophile Carbenium-Ion des HBTUs an.

Unter Austritt der Benzotriazolyl-Abgangsgruppe entsteht ein sehr reaktives Tetramethylharnstoff-Intermediat, welches wiederum nukleophil durch HOBt attackiert wird. Es bildet sich ein Benzotriazolyl-Ester, der die eigentliche aktive Spezies bei der Peptidbindungsbildung darstellt. Der freie N-Terminus des harzgebundenen Peptides verdrängt die Benzotriazolyl-Abgangsgruppe des Aktivesters, wodurch die Peptidkette um eine Aminosäure elongiert wird (siehe Abb. 3.3). Um quantitative Reaktionen zu garantieren, wurde ein dreifacher Überschuss der Fmoc-geschützten Aminosäure verwendet.

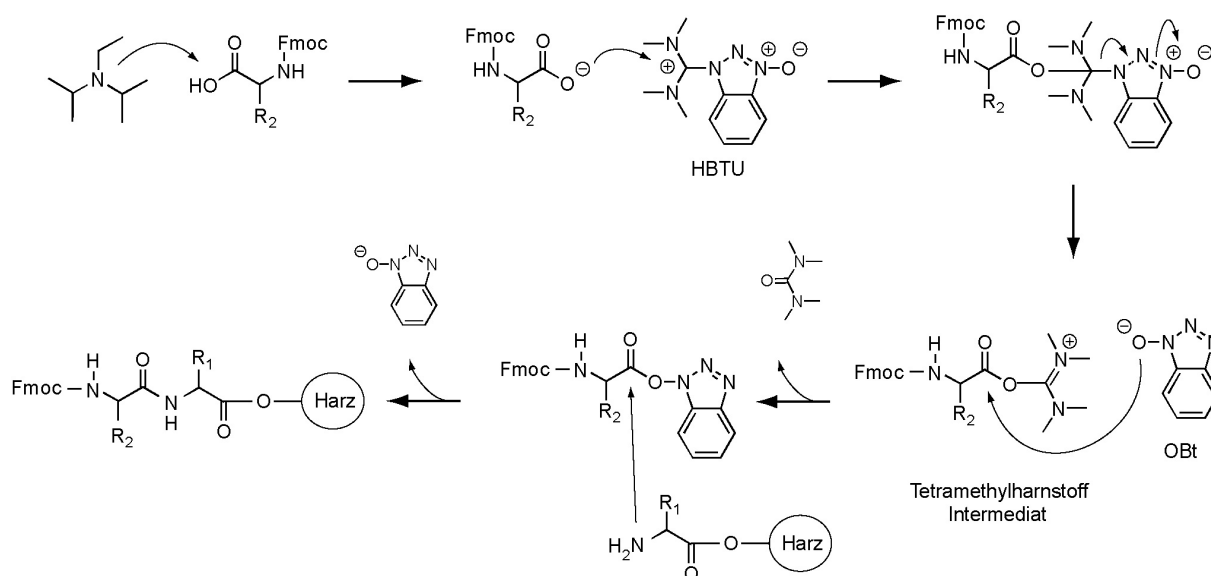


Abbildung 3.3: Schematischer Ablauf der Aminosäureaktivierung und Peptidbindungsbildung.

3.4.3 Die Termination der Peptidsynthese: Die Abspaltung vom Harz

Die Abspaltung des fertigen Seitenketten-geschützten Peptids vom säurelabilen Chlorotritylchlorid-Harz gelingt durch Zusatz eines Abspaltgemisches aus AcOH/TFE/DCM (1:2:7). In dieser Arbeit wurde das Peptidyl-Harz für 2 h in diesem Abspaltgemisch gerührt. Das abgespaltene Peptid wurde durch Filtration vom Harz getrennt und anschließend mit Hexan ausgefällt. Das Lösungsmittelgemisch wurde am Rotationsverdampfer entfernt.

3.5 Organische Synthese

3.5.1 Peptidsynthese

Lineare Peptide wurden mittels eines Advanced ChemTech APEX 396 Peptid-Synthesizers (0.1 mM Ansatz, HBTU/HOBt-Aktivierung) an einem mit der gewünschten C-terminalen Aminosäure beladenen 2-Chlorotritylchlorid-Harz synthetisiert (siehe Abschnitt 3.4). Dazu wurden Fmoc-geschützte Monomere verwendet. Für die Kupplung von Fmoc-Pro-OH an Peptidylharze mit N-terminalem *N*-Me-Phe-OH wurde eine in der Literatur beschriebene razemisierungsfreie Triphosgen-Kupplungsmethode verwendet (Thern et al., 2002). Dazu wurde das Peptidyl-Harz in wasserfreiem THF (1 mL) für 15 min vorgequollen. Währenddessen wurde die zu kuppelnde Fmoc-Aminosäure (3.5 eq.) in einer Lösung von Triphosgen (68 mM) in wasserfreiem THF gelöst (2.4 mL; 1.15 eq. Triphosgen). Zu der klaren Lösung wurde sym-Collidin (10 eq.) gegeben, und es wurde die Fällung von Collidinhydrochlorid beobachtet. Das Harz wurde nun mit DIPEA (8 eq.) versetzt. Unmittelbar danach wurde die zuvor vorbereitete Suspension zum Harz gegeben und für 3h geschüttelt. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt und das Harz gewaschen.

Bei allen synthetisierten Peptiden wurden für die Schützung der funktionellen Gruppen der Seitenketten die folgenden Schutzgruppen verwendet: ^tBu für Thr und Ser, Boc für L-Papa. Bei Substraten, die eine säureempfindliche *N*-Alkyl-Aminosäuretriade enthalten, wurde Thr ohne Seitenkettenschutzgruppe verwendet, um den sauren Entschützungsschritt zu umgehen. Die Abspaltung vom Harz wurde bei diesen Peptiden durch 15 minütige Behandlung mit einer 1:5-Mischung aus 1,1,1,3,3,3-Hexafluoro-2-Propanol und DCM vorgenommen.

3.5.2 Synthese von Peptidyl-SNAC-Substraten

Die seitenkettengeschützten Peptide (1 eq.) wurden in DCM (2 mL) gelöst. Anschließend wurden DCC (2 eq.), HOBt (2 eq.), *N*-Acetyl-Cysteamin (SNAC) (10 eq.) und Kaliumcarbonat (2 eq.) hinzugefügt. Die Reaktionsmischung wurde bei Raumtemperatur für 3h gerührt. Nach Entfernung des DCM wurden die entstandenen seitenkettengeschützten Peptidylthioester für 2 h mit 95:2.5:2.5 TFA:H₂O:Triisopropylsilan (TIPS) (2 mL) gerührt. Anschließend wurden die entschützten Peptidylthioester mit eiskaltem Diethylether (30 mL) ausgefällt. Nach Zentrifugation und Abdekantierung des Ethers wurde der verbleibende Feststoff in 50% Acetonitril/Wasser aufgenommen. Die Peptidylthioester wurden über eine semipräparative C₁₈ Nucleodur Säule (Macherey und Nagel, 250/21, Nucleodur 100-5) unter den folgenden Bedingungen gereinigt: Substrate **1-21**: 0-30 min, 20-60% Acetonitril/0.1%

TFA (v/v) in Wasser/0.1% TFA (v/v), 20 mL/min; Substrate **22-23**: 0-30 min, 35-90% Acetonitril/0.1% TFA (v/v) in Wasser/0.1% TFA (v/v), 20 mL/min. Die Identität der Peptidyl-SNAC-Substrate wurde über HPLC-MS überprüft (Tabelle 3.2).

3.5.3 Synthese von Fmoc-*N*-Methyl-4-(Dimethylamino)-*L*-Phenylalanin

Zu einer Mischung aus Fmoc-*N*-Methyl-4-(Amino)-*L*-Phenylalanin (928.8 mg, 2.30 mmol), 37% wässrigem Formaldehyd (632 μ L, 23.00 mmol) und Essigsäure (1.28 mL, 2.3 mmol) in 15 mL Acetonitril wurde bei Raumtemperatur Natrium-Cyanoborhydrid (222.91 mg, 3.69 mmol) gegeben. Die Mischung wurde über Nacht gerührt und anschließend in Wasser gegossen. Die entstandene Mischung wurde mit konzentrierter Salzsäure auf pH 2 angesäuert. Das Produkt wurde mit DCM extrahiert und mit 0.1 M HCl und Wasser gewaschen. Nach Trocknung über wasserfreiem Natriumsulfat wurden die vereinigten organischen Phasen verdampft. Das Produkt wurde säulenchromatographisch (DCM/Methanol 12/1) gereinigt, wodurch Fmoc-*N*-Methyl-4-(Dimethylamino)-*L*-Phenylalanin erhalten wurde (878.9 mg, 2.02 mmol, 88% Ausbeute).

$^1\text{H-NMR}$: δ_{H} (300 MHz, CDCl_3) 2.96-3.25 [m, 2 H, Ph- CH_2], 3.08 [s, 6 H, NMe_2], 4.16-4.70 [4 H, m, CHCH_2O , CHCH_2Ph], 5.40 [d, 1 H, $J = 7.3$ Hz, NH], 6.90-7.60 [m, 10 H, H aryl], 7.77 [d, 2 H, $J = 7.6$ Hz, H aryl (Fmoc)]

ESI-MS: $m/z = 431.1$ [$\text{M}+\text{H}$] $^+$ (431.2 calc.).

3.6 Analytische Methoden

3.6.1 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrometrie

Die ^1H -Spektren wurden an Advance AC-300 Spektrometern der Firma Bruker vermessen. Die chemischen Verschiebungen (δ) sind in ppm angegeben, die Kopplungskonstanten (J) in Hz. Als interner Standard für die ^1H -Spektren dienen die Restprotonensignale des Lösungsmittels CDCl_3 . Die Multiplizitäten sind wie folgt angegeben: (s = Singulett, d = Dublett, m = Multiplett).

3.6.2 Massenspektrometrie

Alle Substrate und Produkte in dieser Arbeit wurden über HPLC-MS oder MALDI-TOF-MS analysiert.

Die Matrix assisted laser desorption ionization – time of flight (MALDI-TOF) Massenspektrometrie erlaubt die Bestimmung der molekularen Massen eines Peptides im Hochvakuum. 1 μ L der Peptid-Lösung wurde mit 1 μ L einer Dihydroxy-Benzoat (DHB)-Matrix (*Agilent Technologies*) vermischt und auf eine metallische 384-Probenplatte pipettiert. Die kokristallisierten Proben wurden mit Hilfe eines „Bruker Flex III“ (Bruker Daltonics) analysiert.

Zur Charakterisierung und Trennung der in dieser Arbeit beschriebenen Substrate und Produkte wurde die Hochleistungs-Flüssigchromatographie-Massenspektrometrie (HPLC-MS) verwendet. Die untersuchten Substanzgemische wurde dabei auf reversed-phase-Säulen (C18 beschichtetes Silikagel) aufgetragen und durch einen ansteigenden Acetonitril-Wasser-Gradienten eluiert. Die Retentionszeiten wurden durch Messung der Absorption bei 215 nm bestimmt. Die Kopplung mit einem Single-Quadrupol-Elektrospray-Ionization-Massendetektor (ESI) erlaubte die direkte massenspektrometische Analyse der Produkte. Zur Verbesserung der Ionisierung der Analyten wurden den Laufmitteln TFA (0.1 %) oder Triethylamin (2 mM) zugesetzt. Die Experimente wurden auf dem 1100 series HPLC-System (*Agilent*) ausgeführt, welches mit einem ESI-Quad 1100(A)-Series MSD-Massenspektrometer (*Agilent*) gekoppelt war.

4 Ergebnisse

4.1 Chemoenzymatische Synthese von Streptogramin B-Derivaten

Ein Hauptmerkmal nichtribosomal synthetisierter Peptide ist ihre rigide zyklische Struktur, die die bioaktive Konformation dieser Naturstoffe stabilisiert. Die Ausbildung dieser Makrozyklen wird häufig durch in den NRPS-Synthetasen C-terminal gelegene Peptidzyklasen katalysiert, die die kovalent gebundenen linearen Peptidvorläufer unter Zyklisierung von der jeweiligen Synthetase abspalten.

Die folgenden Abschnitte beschäftigen sich mit der biochemischen *in vitro*-Charakterisierung der rekombinanten Zyklase SnbDE-TE der Pristinamycin I Peptidsynthetase SnbDE aus dem Aktinomyceten *Streptomyces pristinaespiralis*. Für diese Untersuchungen wurde die Zyklase aus dem Kontext der Peptidsynthetase als freistehendes Enzym herausgeschnitten und mit löslichen Peptidylthioester-Substraten inkubiert, die über Festphasenpeptidsynthese (SPPS) hergestellt wurden. Dieser chemoenzymatische Ansatz ermöglicht eine detaillierte Untersuchung der Katalyseeigenschaften der Zyklase. Durch Variation der Aminosäuresequenz der Peptidylthioester-Substrate lassen sich so Aussagen sowohl über Regio- und Stereoselektivität der Makrozyklisierung, als auch über die Substratspezifität und die kinetischen Eigenschaften der Pristinamycin I-Zyklase treffen.

4.1.1 Expression der SnbDE-Zyklase als Thioredoxin-Fusionsprotein

Für die Klonierung und Expression der rekombinanten Pristinamycin I-Zyklase SnbDE-TE aus *Streptomyces pristinaespiralis* wurde der Expressionsvektor pBAD202/D-TOPO (Invitrogen) verwendet. Dieser Vektor fügt eine N-terminale His-patch-Thioredoxindomäne (11.7 kDa) und einen C-terminalen His-tag an die rekombinante Zyklase (46.1 kDa) an. Die Thioredoxindomäne erhöht die Löslichkeit und die Translationseffizienz des exprimierten Proteins (LaVallie et al., 1993). Nach Expression in *Escherichia coli*, Proteinreinigung über Immobilisierte Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC), Entsalzung und Ankonzentrierung wurden 15 mg SnbDE-TE ausgehend von einer Expression im 1L-Maßstab erhalten (Abb. 4.1). Die Proteinidentität wurde über Massenspektrometrie verifiziert.

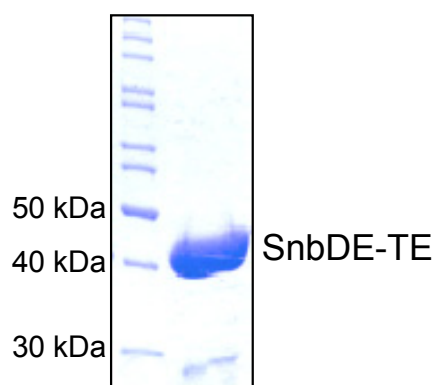


Abbildung 4.1: SDS-PAGE der gereinigten rekombinanten SnbDE-TE.

Die gereinigte ankonzentrierte SnbDE-TE (46.1 kDa) wurde einer SDS-PAGE (12 %) unterzogen und mittels Coomassie blue-Färbung visualisiert.

4.1.2 Peptidzyklisierung synthetischer Peptidylthioester-Substrate

Um die Fähigkeit der Pristinamycin I-Zyklase zu untersuchen, Streptogramin B-Thioester-Substrate zu zyklisieren, wurde der lineare Peptidylthioester **L-Phe₇-PLP-SNAC (1)** synthetisiert, dessen Aminosäuresequenz möglichst analog zum nicht oxidierten S_B-Antibiotikum PI_E ist (L-Pip anstatt 4-oxo-L-Pip an Position 6), dem Primärprodukt der nichtribosomalen Peptidsynthese (siehe Abb. 1.7). Aus synthetischen Gründen wurde N-Methyl-Dmpapa₅ durch 4-Amino-Phenylalanin₅ (Papa₅) ersetzt. Außerdem wurde der C-terminale Phg-Rest wegen seiner bekannten hohen Empfindlichkeit gegen Razemisierung (Sewald und Jakubke, 2002b) gegen Phe ersetzt, woraus sich für **1** folgende Aminosäuresequenz ergibt: HPA₁ – Thr₂ – DAbu₃ – Pro₄ – Papa₅ – Pip₆ – Phe₇ – SNAC (Abb. 4.2).

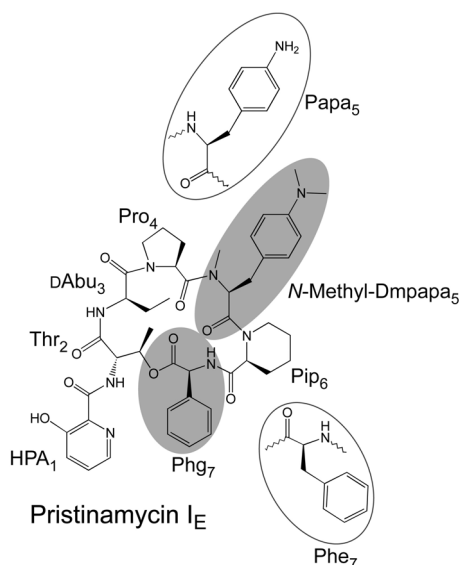


Abbildung 4.2: Abweichungen der Aminosäuresequenz von L-Phe₇-PLP-SNAC (1**) von Pristinamycin I_E.**

Die Abbildung zeigt die Strukturformel von Pristinamycin I_E. Die durch Schattierung hervorgehobenen Aminosäuren wurden in der Aminosäuresequenz des Peptidylthioester-Substrats **1** aus synthetischen Gründen durch die neben der Strukturformel dargestellten Aminosäuren ersetzt.

Der synthetische Peptidylthioester **1** wurde mit der rekombinanten Zyklastase inkubiert und die Reaktionsmischung über HPLC-MS analysiert (Tab. 3.2). Es wurde eine parallele Bildung des zyklischen Produkts und des Hydrolysats mit einem Zyklisierungs-zu-Hydrolyse-Verhältnis von 1:1 beobachtet (Abb. 4.3). Dieses Ergebnis zeigt die Fähigkeit der rekombinanten Zyklastase SnbDE-TE, synthetische Substratanaloga zu zyklisieren. Aufgrund dieses Ergebnisses und seiner Stabilität gegen Razemisierung wurde der Peptidylthioester **1** in den folgenden Untersuchungen zur Regio- und Stereoselektivität sowie zur Substratspezifität als Referenzsubstrat verwendet.

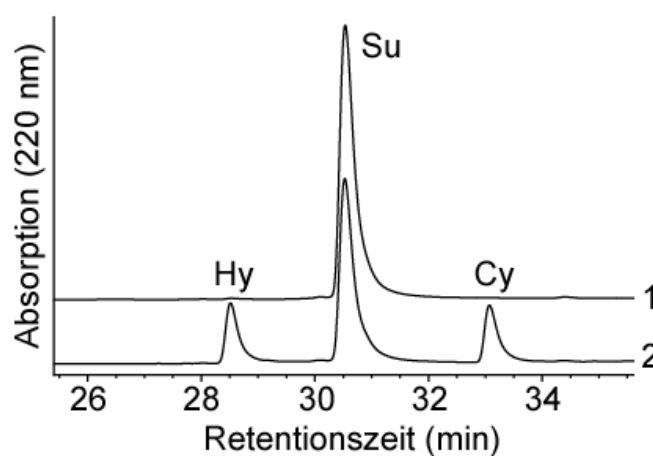


Abbildung 4.3: HPLC-MS Analyse der Inkubation von L-Phe₇-PLP-SNAC (1**) mit der SnbDE-Zyklastase.**

Die SnbDE-Zyklastase wurde bei 25 °C für 3h mit **1** inkubiert. Spur 1 zeigt die Analyse einer Inkubation ohne Enzym, Spur 2 die Analyse einer Inkubation mit Enzym. Su = Substrat, Hy = Hydrolysat, Cy = Zyklus.

4.1.3 Regioselektivität der SnbDE-Zyklase

Das Substrat **L-Phe₇-PLP-SNAC (1)** enthält drei Nukleophile, die während der Zyklisierungsreaktion miteinander konkurrieren können: Die Hydroxylfunktionen der 3-Hydroxy-Picolinsäure₁ (HPA₁) und von Thr₂, und die Amino-Funktion von Papa₅, welche in der natürlichen Peptidsequenz von PI_E dimethyliert ist. Um die Regioselektivität der enzymatischen Zyklisierung zu untersuchen, wurden die zwei weiteren SNAC-Substrate **Picolinsäure₁ (PA₁)-Ala₂-Phe₇-PLP-SNAC (2)** und **Ala₂-Phe₅-Phe₇-PLP-SNAC (3)** synthetisiert. In beiden Verbindungen wurde das Zyklisierungsnukleophil L-Thr des natürlichen Pristinamycins I (Preud'homme et al., 1968) durch Ala ersetzt, um diese favorisierte Zyklisierung zu verhindern. Verbindung **2** enthält folglich nur die Amino-Funktion von Papa₅ und Verbindung **3** nur die Hydroxylfunktion der HPA₁ als mögliches Zyklisierungsnukleophil. HPLC-MS-Analysen von enzymatischen Zyklisierungsassays mit beiden Substraten zeigten nur die Bildung der korrespondierenden Hydrolyseprodukte, es konnte keine Zyklisierung detektiert werden (Abb. 4.4, Tab. 4.1, Tab. 3.2). Dieses Ergebnis zeigt eine ausgeprägte Regioselektivität der Pristinamycin I-Zyklase für das natürliche Zyklisierungsnukleophil L-Thr.

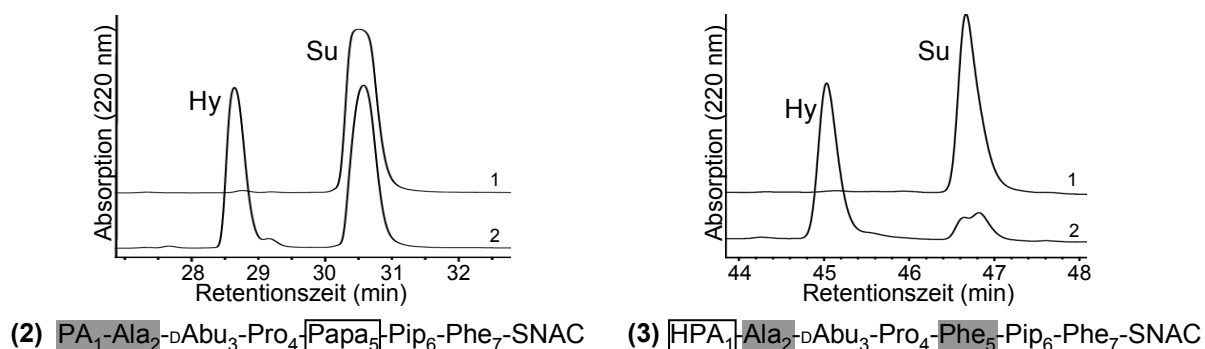


Abbildung 4.4: Regioselektivität der SnbDE-Zyklase.

HPLC-Analysen von Inkubationen der SnbDE-Zyklase mit den Peptidyl-SNAC-Substraten **2** und **3** für 3h bei 25 °C (HPLC-Spuren 2). Die Spuren 1 zeigen Inkubationen in Abwesenheit des Enzyms. Die Schattierungen in der Aminosäuresequenz des Substrats heben Abweichungen zur Sequenz des Referenzsubstrats **1** hervor, die Rahmen markieren das in den Substraten **2** und **3** jeweils verbleibende Nukleophil. Su = Substrat, Hy = Hydrolysat.

Tabelle 4.1: Substrate zur Untersuchung der Regioselektivität¹.

Nummer der Verbindung	Name der Verbindung	Peptidsequenz	Cy/Hy
1	Phe₇-PLP-SNAC (Referenz)	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	1.0
2	PA₁-Ala₂-Phe₇-PLP-SNAC	PA ₁ -Ala ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0
3	Ala₂-Phe₅-Phe₇-PLP-SNAC	HPA ₁ -Ala ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Phe ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0

HPA, 3-Hydroxy-Picolinsäure; Abu, 2-Amino-Buttersäure; Papa, 4-Amino-Phenylalanin; Pip, Pípecolinsäure; Cy/Hy, Verhältnis von Zyklisierung zu Hydrolyse.

¹ Die Referenzsequenz und Abweichungen von dieser Sequenz in den anderen Substraten sind durch Schattierung hervorgehoben.

4.1.4 Stereoselektivität der SnbDE-Zyklase

Um die Stereoselektivität der Pristinamycin I-Zyklase in Bezug auf das Zyklisierungsnukleophil zu untersuchen, wurden zwei weitere Peptidyl-SNAC-Substrate synthetisiert. Im Substrat **D-Thr₂-Phe₇-PLP-SNAC (4)** wurde das natürliche Zyklisierungsnukleophil L-Thr₂ gegen D-Thr₂ ausgetauscht. In enzymatischen Assays mit diesem Substrat konnte keine Zyklisierung sondern lediglich Hydrolyse des Peptidylthioesters beobachtet werden. Dies zeigt die Wichtigkeit der L-Konfiguration des Thr an Position 2 für die Zyklisierung (Abb. 4.5 A, Tab. 4.2, Tab. 3.2). Um den Einfluß der Beziehung zwischen den beiden Stereozentren der Thr-Seitenkette auf die Zyklisierungseffizienz zu untersuchen, wurde das Substrat **L-*allo*-Thr₂-Phe₇-PLP-SNAC (5)** verwendet, welches L-*allo*-Thr an Position 2 enthält. Auch in enzymatischen Assays unter Verwendung dieses Substrats konnte keine Zyklisierung beobachtet werden, aber ein großer Anteil an Hydrolyse (Abb. 4.5 B, Tab. 4.2, Tab. 3.2). Diese Ergebnisse belegen eine hohe Stereoselektivität der SnbDE-Zyklase für beide Stereozentren des Thr-Nukleophils.

Um die Stereoselektivität in Bezug auf die C-terminale Aminosäure zu untersuchen, wurde das Substrat **6** synthetisiert, in dem L-Phe₇ gegen D-Phe₇ ausgetauscht wurde. Mit diesem Substrat konnte ausschließlich ein sehr kleiner Anteil an Hydrolyseprodukt, aber keine Zyklisierung beobachtet werden (Abb. 4.5 C, Tab. 4.2, Tab. 3.2).

Zusammenfassend besitzt die SnbDE-Zyklase also eine ausgesprochen hohe Stereoselektivität sowohl für das Zyklisierungsnukleophil L-Thr₂, als auch für die C-terminale Aminosäure L-Phe₇.

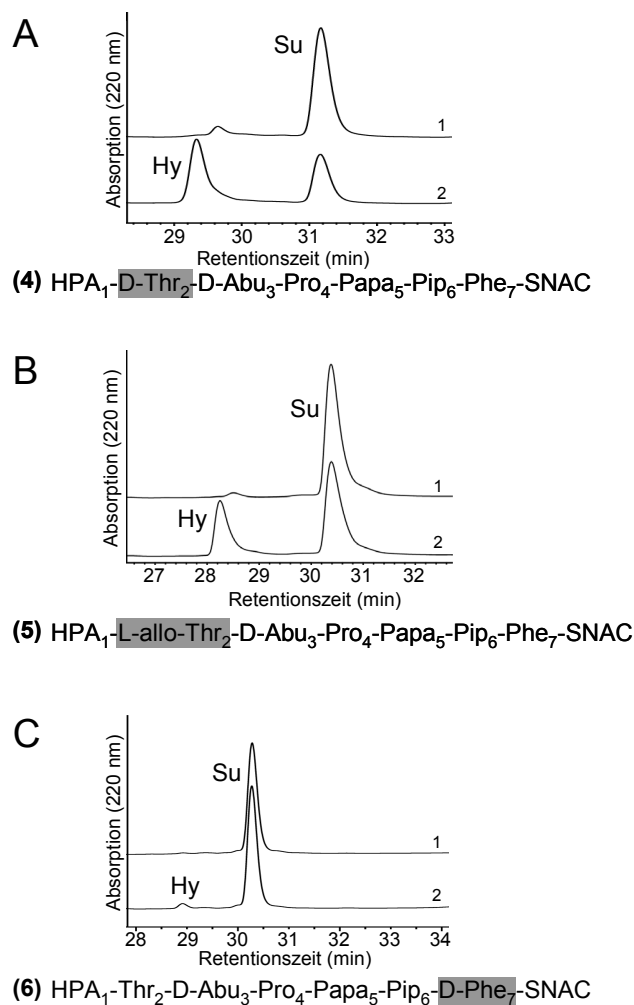


Abbildung 4.5: Stereoselektivität der SnbDE-Zyklase.

HPLC-Analysen von Inkubationen der SnbDE-Zyklase mit den Peptidyl-SNAC-Substraten **4, 5 und 6** (A-C) für 3h bei 25 °C (HPLC-Spuren 2). Die Spuren 1 zeigen Inkubationen in Abwesenheit des Enzyms. Die Schattierungen in der Aminosäuresequenz des Substrates heben Abweichungen zur Sequenz des Referenzsubstrats **1** hervor. Su = Substrat, Hy = Hydrolysat.

Tabelle 4.2: Substrate zur Untersuchung der Stereoselektivität¹.

Nummer der Verbindung	Name der Verbindung	Peptidsequenz	Cy/Hy
1	Phe₇-PLP-SNAC (Referenz)	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	1.0
4	D-Thr₂-Phe₇-PLP-SNAC	HPA ₁ - D-Thr₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0
5	L-allo-Thr₂-Phe₇-PLP-SNAC	HPA ₁ - L-allo-Thr₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0
6	D-Phe₇-PLP-SNAC	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ - D-Phe₇ -SNAC	0

HPA, 3-Hydroxy-Picolinsäure; Abu, 2-Amino-Buttersäure; Papa, 4-Amino-Phenylalanin; Pip, Pípecolinsäure; Cy/Hy, Verhältnis von Zyklisierung zu Hydrolyse.

¹ Die Referenzsequenz und Abweichungen von dieser Sequenz in den anderen Substraten sind durch Schattierung hervorgehoben.

4.1.5 Zyklisierung razemisierungsempfindlicher Substratanaloga

Im letzten Abschnitt wurde gezeigt, dass die SnbDE-Zyklase eine ausgesprochen hohe Stereoselektivität in Bezug auf die C-terminale Aminosäure aufweist. Im natürlichen Pristinamycin handelt es sich bei der C-terminalen Aminosäure um L-Phg. Es ist bekannt, dass diese Aminosäure aufgrund einer Resonanzstabilisierung der Enolat-Form nach Deprotonierung des C α -Atoms sehr empfindlich gegen Razemisierung ist (Sewald und Jakubke, 2002b), wodurch die Synthese eines stereochemisch einheitlichen Peptidylthioester-Substrats erschwert wird.

Die beobachtete ausgeprägte Stereoselektivität der SnbDE-Zyklase sollte die Möglichkeit der Entwicklung eines chemoenzymatischen Ansatzes erlauben, durch den man trotz der Razemisierungsempfindlichkeit des Phg-Restes in der Lage ist, stereochemisch einheitliche Streptogramin-Varianten zu synthetisieren. Um diese Möglichkeit zu testen, wurde das Peptidyl-SNAC-Substrat **Phg₇-PLP-SNAC (7)** synthetisiert (Tab. 4.3). Dieses Substrat gleicht dem Referenzsubstrat **1** bis auf den Austausch des C-terminalen Phe₇ gegen Phg₇ und ist damit das dem PI_E ähnlichste Substrat der in dieser Studie verwendeten Verbindungen.

Während der Synthese des **Phg₇-PLP**-Peptids traten erwartete Probleme mit der Integrität des Stereozentrums des C-terminalen Phg auf. HPLC-MS-Analysen der Peptide nach Abspaltung vom Harz zeigten zwei verschiedene Epimere in einem Verhältnis von 1:1. Im Gegensatz dazu wiesen Analoga, die anstatt Phg₇ L-Phe₇ am C-Terminus enthielten, in HPLC-Analysen nur einen Peak auf. Dies zeigt, dass während der Peptidsynthese nur der Phg-Rest einen Verlust der chiralen Integrität erfährt. Trotz allem wurde das erhaltene Epimerengemisch für die Synthese von **Phg₇-PLP-SNAC (7)** eingesetzt.

Tabelle 4.3: Substrat mit C-terminalem Phg¹.

Nummer der Verbindung	Name der Verbindung	Peptidsequenz	Cy/Hy
1	Phe₇-PLP-SNAC (Referenz)	HPA ₁ -Thr ₂ -bAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	1.0
7	Phg₇-PLP-SNAC (dem PI _E ähnlichstes Substrat)	HPA ₁ -Thr ₂ -bAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phg ₇ -SNAC	2.0

HPA, 3-Hydroxy-Picolinsäure; Abu, 2-Amino-Buttersäure; Papa, 4-Amino-Phenylalanin; Pip, Pípecolinsäure; Cy/Hy, Verhältnis von Zyklisierung zu Hydrolyse.

¹ Die Referenzsequenz und Abweichungen von dieser Sequenz in den anderen Substraten sind durch Schattierung hervorgehoben.

Beim Versuch, die resultierenden zwei Diastereomere von **7** quantitativ über HPLC zu trennen, konnte lediglich eine Anreicherung jedes einzelnen Epimers erhalten werden, was auf die sehr hohe Razemisierungsempfindlichkeit von **7** selbst unter neutralen Pufferbedingungen zurückzuführen ist. Das Stereozentrum von Phg₇ razemisiert bei Raumtemperatur innerhalb weniger Stunden komplett. Daher wurden in allen enzymatischen Assays Gemische von beiden **Phg₇-PLP-SNAC**-Diastereomeren in unterschiedlichen Mengenverhältnissen eingesetzt. Die Untersuchung der von der SnbDE-Zyklase katalysierten Zyklisierung dieser Substratmischung über HPLC-MS ergab wie erwartet die Bildung zweier hydrolysierter linearer Peptidprodukte ($t_R = 26.43$ min und $t_R = 27.18$ min), jedoch konnte nur ein Zyklisierungsprodukt beobachtet werden (Abb. 4.6, Tab. 3.2).

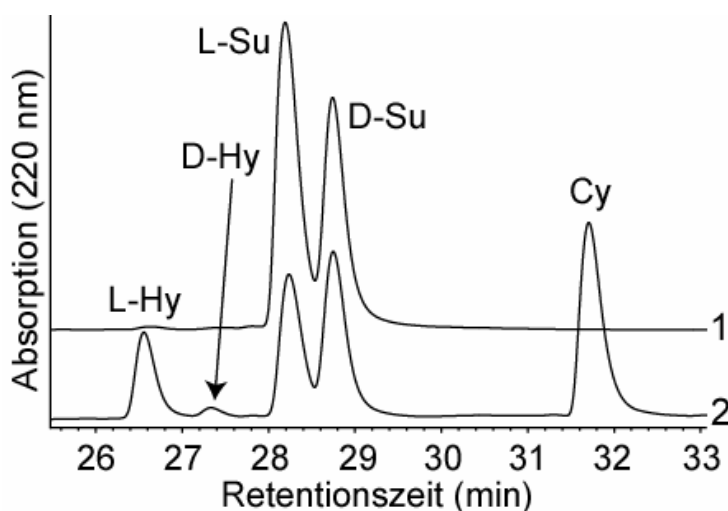


Abbildung 4.6: Reaktionsprofil der Phg₇-PLP-SNAC (7**) - Epimerenmischung mit der SnbDE-Zyklase.** HPLC-Analyse einer Inkubation der SnbDE-Zyklase mit der Epimerenmischung von **7** bei 25 °C für 3h (Spur 2). Spur 1 zeigt die Analyse einer Inkubation ohne Enzym. Su = Substrat, Hy = Hydrolysat, Cy = Zyklus.

Im Gegensatz zu der Substratmischung zeigen die Hydrolyseprodukte und das Zyklisierungsprodukt keine Razemisierungsempfindlichkeit unter neutralen Pufferbedingungen. Betrachtet man die Ergebnisse des letzten Abschnitts, in dem eine ausgeprägte Stereoselektivität der SnbDE-Zyklase für L-Aminosäuren an der C-terminalen Position gezeigt wurde, so kann man unter der Voraussetzung, dass es sich bei dem gebildeten Zyklus um eine stereochemisch einheitliche Verbindung handelt, erschließen, dass der einzelne in den enzymatischen Assays mit **7** beobachtete Zyklisierungsspeak ($t_R = 31.6$ min) das natürliche L-Phg enthaltende Makrolakton repräsentiert, während das D-Phg enthaltene Substrat ausschließlich hydrolysiert wird. Der Beweis, dass es sich bei dem beobachteten Zyklisierungsprodukt tatsächlich um eine stereochemisch einheitliche Verbindung handelt, ist Thema des nächsten Abschnitts.

4.1.6 Enzymatische Öffnung des Makrolaktons – Beweis der einheitlichen Stereochemie des Makrozyklus

Es ist bekannt, dass einige rekombinante Zyklasen der nichtribosomalen Peptidsynthetasen in der Lage sind, die korrespondierenden Makrozyklen in einer zur Makrozyklisierung reversen Reaktion wieder zu öffnen (Grünwald et al., 2004b; Tseng et al., 2002). Diese Tatsache wurde hier ausgenutzt, um zu bestätigen, dass es sich bei dem durch die Umsetzung von **7** gebildeten zyklischen Produkt tatsächlich ausschließlich um das natürliche stereochemisch einheitliche L-Phg enthaltende Makrolakton handelt. Der Makrozyklus wurde über HPLC isoliert, lyophilisiert und anschließend erneut mit der SnbDE-Zyklase im Assaypuffer inkubiert. Sollte die SnbDE-Zyklase in der Lage sein, den Zyklus enzymatisch zu öffnen, sollten die gebildeten linearen Hydrolyseprodukte Aufschluß über die Identität des Makrozyklus geben. Eine Inkubation über 24 h bei Raumtemperatur ergab eine quantitative Hydrolyse des Zyklus. Mittels HPLC-Analyse konnte ausschließlich ein Hydrolysepeak ($t_R = 26.43$ min) detektiert werden (Abb. 4.7), was die optische Reinheit des enzymatisch gebildeten Makrozyklus klar beweist. Weiterhin zeigt dieses Ergebnis aufgrund der bekannten Stereoselektivität der Zyklase, dass es sich bei dem bei $t_R = 26.43$ min eluierenden Hydrolyseprodukt um das natürliche L-Phg enthaltende Hydrolysat handelt, während das D-Phg enthaltende Hydrolysat bei $t_R = 27.18$ min eluiert.

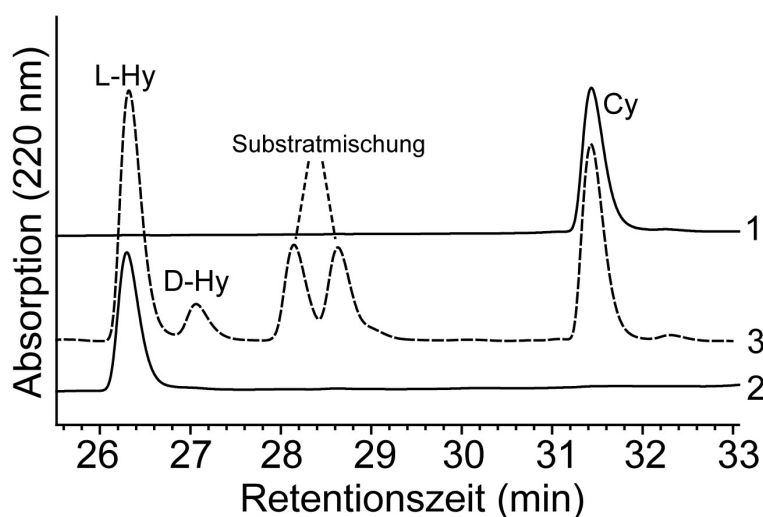


Abbildung 4.7: Enzymatische Öffnung des Phg enthaltenden enzymatisch gebildeten Makrolaktons.

Spur 1: Isoliertes aus **7** gebildetes zyklisches Produkt vor der Inkubation mit der Zyklase.

Spur 2: Analyse des isolierten Zyklus nach einer Inkubation von 24 h mit der SnbDE-Zyklase bei 25 °C.

Spur 3 (gestrichelte Linie): HPLC-Analyse einer Diastereomerenmischung von **7** nach Inkubation mit der SnbDE-Zyklase zum Vergleich der Retentionszeiten. Hy = Hydrolysat, Cy = Zyklus.

4.1.7 Zeitaufgelöste Umsetzung der Phg₇-PLP-SNAC-Epimerenmischung

Um die enzymatische Umsetzung der Diastereomerenmischung von **Phg₇-PLP-SNAC (7)** noch detaillierter zu untersuchen, wurden zeitaufgelöste enzymatische Zyklisierungsassays mit einer 1:1-Mischung der beiden Epimere durchgeführt (Abb. 4.8). Analysen dieser Untersuchungen zeigten, dass der linke Hydrolysepeak ($t_R = 26.43$ min) mit der Zeit wesentlich schneller wächst, als der rechte ($t_R = 27.18$ min). Diese Beobachtung korrespondiert mit der im vorigen Abschnitt gewonnenen Erkenntnis, dass der linke Hydrolysepeak ($t_R = 26.43$ min) das L-Phg enthaltende Hydrolysat repräsentiert: Offensichtlich ist auch im Fall der enzymatischen Hydrolyse das L-Phg enthaltende Substrat begünstigt. Weiterhin zeigten die zeitaufgelösten Assays, dass das zum linken Substratpeak (L-Su) ($t_R = 28.26$ min) korrespondierende Substrat-Diastereomer schneller in die Produkte überführt wird, als das zum rechten Substratpeak (D-Su) ($t_R = 28.74$ min) korrespondierende Substrat-Diastereomer (Abb. 4.8). Hieraus lässt sich schließen, dass der linke Substratpeak zum natürlichen L-Phg-Diastereomer gehört, welches von der Zyklase entweder zyklisiert oder hydrolysiert wird, während der rechte Substratpeak das unnatürliche D-Phg-Diastereomer repräsentiert, welches durch die Zyklase ausschließlich langsam hydrolysiert wird bzw. langsam unkatalysiert razemisiert. Die insgesamt betrachtete Produktbildung (Summe aus Zyklisierung und Hydrolyse) aus dem natürlichen L-Phg enthaltenden Substrat geschieht 30-mal schneller als die Produktbildung (Hydrolyse) aus dem unnatürlichen D-Phg enthaltenden Substrat. Die zyklischen und die L- und D-Hydrolyse-Produkte werden in einem Verhältnis von 2:1:0.1 gebildet (Tab. 4.3.).

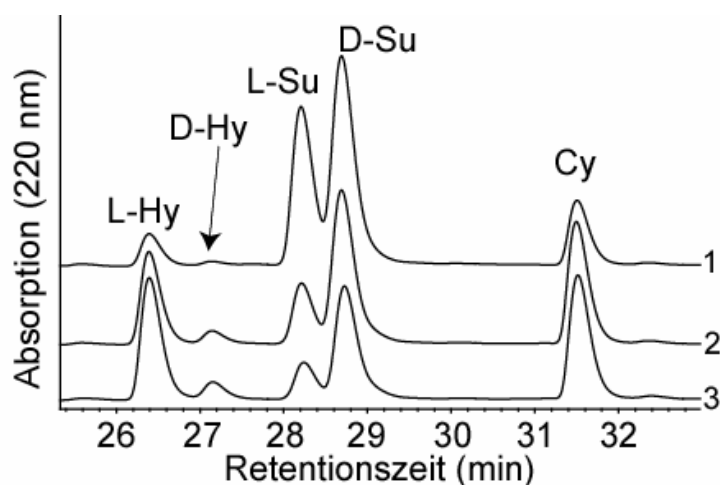


Abbildung 4.8: Zeitaufgelöster Assay einer 1:1 Diastereomerenmischung von Phg₇-PLP-SNAC.

Die Abbildung zeigt HPLC-Analysen von Proben einer Inkubation eines 1:1-Gemischs der Diastereomere von **7** mit der SnbDE-Zyklase bei 25 °C, die zu verschiedenen Zeitpunkten abgestoppt wurden. Nach 2h wurde frisches Enzym zu der Reaktionsmischung gegeben, so dass eine Endkonzentration von 10 µM erreicht wurde. Spur 1: 34 min; Spur 2: 175 min; Spur 3: 265 min. Hy = Hydrolysat, Su = Substrat, Cy = Zyklus.

4.1.8 Phg₇-enthaltende Substrate: Dynamische Kinetische Resolution

Betrachtet man die zeitaufgelösten Assays (Abb. 4.8) genau, so fällt ein sehr interessantes Phänomen auf: Die Abnahme des unnatürlichen aus der Razemisierung hervorgegangenen D-Phg₇ enthaltenden Substrats in den enzymatischen Assays ist stärker als die Zunahme des unnatürlichen D-Phg₇ enthaltenden Hydrolyseprodukts. Außerdem ist die Zunahme des Zyklus und des natürlichen L-Phg₇ enthaltenden Hydrolysats stärker als die Abnahme des L-Phg₇ enthaltenden Substrats. Diese Beobachtung zeigt einen präparativ nützlichen Reaktionsweg auf: Das D-Phg₇-Substrat wird durch eine während des Assays stattfindende *in situ*-Razemisierung zum L-Phg₇-Substrat transformiert und umgekehrt. Eine selektive gleichzeitig stattfindende enzymatische Umsetzung des L-Phg₇-PLP-SNAC-Diastereomers verschiebt das Razemisierungsgleichgewicht kontinuierlich auf die Seite der L-Phg₇-PLP-SNAC-Diastereomere. Diese dynamische kinetische Resolution (DKR) (Turner, 2004) ermöglicht aus einer 1:1-Mischung der Substratdiastereomere eine Ausbeute an natürlich konfiguriertem Produkt, die deutlich höher als 50% ist. Die Existenz dieses Reaktionswegs wurde zusätzlich durch einen Assay belegt, der von einer Substratmischung ausging, in der hauptsächlich das unnatürliche D-Phg₇-PLP-SNAC-Diastereomer vorlag. Eine komplette enzymatische Umsetzung dieser Mischung einschließlich der Öffnung des gebildeten Makrozyklus überführte diese Substratmischung in die beiden Hydrolyseprodukte mit 77 % L-Phg- und 23 % D-Phg-Konfiguration (Abb. 4.9).

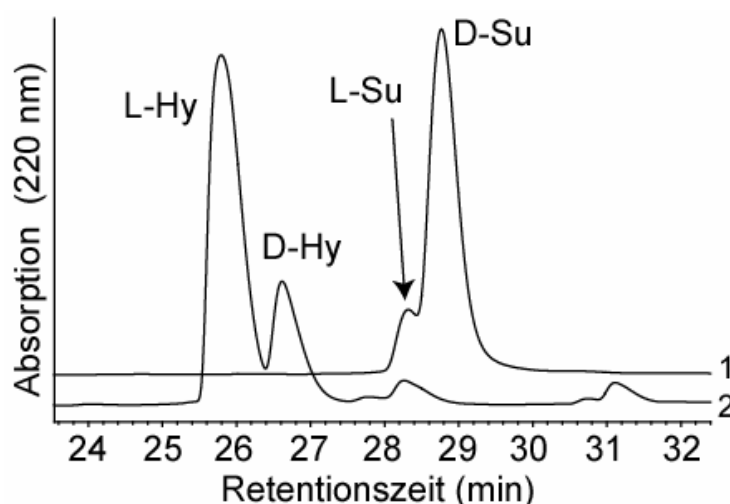


Abbildung 4.9: Assay einer D-Isomer angereicherten Epimerenmischung von 7.

Spur 1: Substratmischung zu Beginn der Reaktion. Spur 2: Analyse nach einer Inkubation von 24h mit der SnbDE-Zyklase bei 25 °C. Alle 4h wurde frisches Enzym hinzugegeben. Der gebildete Zyklus wurde durch die lange Inkubation wieder hydrolysiert. Hy = Hydrolysat, Su = Substrat.

4.1.9 Substratspezifität der SnbDE-Zyklase

Aufgrund der Razemisierungsempfindlichkeit der Phg₇-enthaltenden Substrate ist in allen Substratmischungen von **Phg₇-PLP-SNAC (7)** immer auch das unnatürliche **D-Phg₇-PLP-SNAC**-Diastereomer vorhanden. Dieses Epimer hemmt durch seine Bindung an das aktive Zentrum der Zyklase und seine langsame enzymkatalysierte Hydrolyse möglicherweise zu einem gewissen Teil die enzymatisch katalysierte Umsetzung des **L-Phg₇-Substratdiastereomers**. Dadurch werden alle Untersuchungen zur Substratspezifität der SnbDE-Zyklase und die separate Bestimmung der kinetischen Parameter k_{cat} und K_{M} der enzymatischen Reaktion für Substrate mit C-terminalem Phg₇ erschwert. Aus diesem Grund wurde in dieser Untersuchung das razemisierungsstabile Substrat **L-Phe₇-PLP-SNAC (1)** als Basissequenz für die Substratspezifitätsuntersuchungen und als Referenzsubstrat für die kinetischen Untersuchungen verwendet. Dieses Referenzsubstrat wird von der Zyklase in einem Verhältnis von Zyklisierung zu Hydrolyse von 1:1 in die Produkte überführt, während dieses Verhältnis für das dem PI_E ähnlichste Substrat **7** 2:1 beträgt (Abb. 4.3, Abb. 4.6, Tab. 4.3). Trotz dieses besseren Verhältnisses wurde aus den genannten experimentellen Gründen an **1** als Referenzsubstrat festgehalten.

4.1.9.1 Der Alanin-Scan

Um die Substrattoleranz der SnbDE-Zyklase detailliert zu untersuchen, wurde eine Reihe von Peptidyl-SNAC-Varianten synthetisiert, welche sich von der Sequenz des Referenzsubstrats **1** durch einzelne oder doppelte Aminosäuresubstitutionen unterscheiden. Zunächst wurden die Substrate **8-13** synthetisiert, in denen jeweils einzeln der Rest 1 gegen Ac-L-Ala und die Reste 3-7 ohne Änderung der Konfiguration des C_α-Atoms gegen Ala ausgetauscht wurden. In enzymatischen Assays wurden für diese Substrate die Verhältnisse von Zyklisierung zu Hydrolyse bestimmt (Tab. 4.4). Für das Substrat **Ac-Ala₁-Phe₇-PLP-SNAC** konnte keine Zyklisierung beobachtet werden. Dies zeigt, dass die Identität der Position 1 der Peptidsequenz auf die Zyklisierungseffizienz entscheidenden Einfluss hat. Die Substitution von D-Abu₃ durch D-Ala₃ im Substrat **9** führte zu einer Abnahme des Verhältnisses von Zyklisierung zu Hydrolyse von 1 (Referenzsubstrat **1**) auf 0.6. Im Gegensatz dazu wurden separate Austausche gegen Ala an den Positionen 4,5,6 und 7 (Substrate **10-13**) von der SnbDE-Zyklase toleriert: Diese Substitutionen führten in Bezug auf das Referenzsubstrat **1** zu vergleichbaren oder verbesserten Zyklisierungs-zu-Hydrolyse-Verhältnissen.

Zusammenfassend lässt sich aus den Resultaten des präsentierten Ala-Scans schließen, dass der Rest HPA₁ essentiell für die Zyklisierung ist, während der Rest D-Abu₃ einen wichtigen

Einfluss auf das Verhältnis von Zyklisierung zu Hydrolyse hat. Das bedeutet, dass die beiden L-Thr₂ umrahmenden Reste wichtig für die Positionierung dieses Zyklisierungsnukleophils zu sein scheinen. Die einzige invariante Position ist Position 1. Austausche aller anderen Positionen werden von der Zyklastase toleriert.

Tabelle 4.4: Substratspezifität der SnbDE-Zyklase: Der Ala-Scan¹.

Nummer der Verbindung	Name der Verbindung	Peptidsequenz	Cy/Hy
1	Phe₇-PLP-SNAC (Referenz)	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	1.0
8	Ac-Ala₁-Phe₇-PLP-SNAC	Ac-Ala ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0
9	D-Ala₃-Phe₇-PLP-SNAC	HPA ₁ -Thr ₂ -DAla ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0.6
10	Ala₄-Phe₇-PLP-SNAC	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Ala ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	1.7
11	Ala₅-Phe₇-PLP-SNAC	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Ala ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0.9
12	Ala₆-Phe₇-PLP-SNAC	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Ala ₆ -Phe ₇ -SNAC	1.2
13	Ala₇-PLP-SNAC	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Ala ₇ -SNAC	1.7

HPA, 3-Hydroxy-Picolinsäure; Abu, 2-Amino-Buttersäure; Papa, 4-Amino-Phenylalanin; Pip, Pípecolinsäure; Cy/Hy, Verhältnis von Zyklisierung zu Hydrolyse.

¹ Die Referenzsequenz und Abweichungen von dieser Sequenz in den anderen Substraten sind durch Schattierung hervorgehoben.

4.1.9.2 Der Einfluss von Position 1 auf die Zyklisierung

Um die beobachtete Invariabilität der Position 1 genauer zu untersuchen, wurden die Substrate **14-16** synthetisiert, in denen HPA₁ jeweils durch Picolinsäure (PA), 2-Hydroxy-Benzoessäure (HBA) oder Benzoessäure (BA) ersetzt wurde. Durch enzymatische Transformation dieser Substrate sollte der Einfluss der Hydroxylfunktion und des N-Atoms der HPA auf die Zyklisierungseffizienz ermittelt werden. Mit allen drei Substraten fiel das Zyklisierungs-zu-Hydrolyse-Verhältnis von 1 (Referenzsubstrat **1**) auf ca. 0.5 (Tab. 4.5).

Tabelle 4.5: Substratspezifität der SnbDE-Zyklase: Der Einfluss von Position 1¹.

Nummer der Verbindung	Name der Verbindung	Peptidsequenz	Cy/Hy
1	Phe₇-PLP-SNAC (Referenz)	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	1.0
8	Ac-Ala₁-Phe₇-PLP-SNAC	Ac-Ala ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0
14	PA₁-Phe₇-PLP-SNAC	PA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0.5
15	HBA₁-Phe₇-PLP-SNAC	HBA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0.4
16	BA₁-Phe₇-PLP-SNAC	BA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0.4

HPA, 3-Hydroxy-Picolinsäure; PA, Picolinsäure; HBA, 3-Hydroxy-Benzoessäure; BA, Benzoessäure; Abu, 2-Amino-Buttersäure; Papa, 4-Amino-Phenylalanin; Pip, Pípecolinsäure; Cy/Hy, Verhältnis von Zyklisierung zu Hydrolyse.

¹ Die Referenzsequenz und Abweichungen von dieser Sequenz in den anderen Substraten sind durch Schattierung hervorgehoben.

Dieses Ergebnis zeigt, dass alle funktionellen Gruppen der HPA relevant für die Zyklisierungseffizienz sind, aber keine dieser Funktionen allein essentiell für die Zyklisierung ist. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die SnbDE-Zyklase eine gewisse Toleranz in Bezug auf die strukturellen Details an Position 1 des Substrats zeigt, aber keinen Austausch an dieser Position gegen deutlich abweichende Bausteine zulässt

4.1.9.3 Variation der Ringgröße der enzymatisch gebildeten Makrolaktone

Um die Substrattoleranz der SnbDE-Zyklase in Bezug auf die Bildung von Makrozyklen unterschiedlicher Ringgröße zu untersuchen, wurden die Substrate **17** und **18** synthetisiert und mit der Zyklase umgesetzt. Im Substrat **17** wurde ein zusätzliches L-Ala zwischen Position 3 und 4 der Referenzsequenz eingefügt, während im Substrat **18** die Aminosäure D-Abu₃ ausgelassen wurde. Mit beiden Substraten wurde eine enzymatische Zyklisierung mit einem Zyklisierungs-zu-Hydrolyse-Verhältnis von ca. 0.5 beobachtet (Tab. 4.6). Dies zeigt eine gewisse Toleranz der SnbDE-Zyklase gegenüber Variationen des Abstands zwischen Zyklisierungsnukleophil und C-terminaler Aminosäure.

Tabelle 4.6: Substratspezifität der SnbDE-Zyklase: Variation der Ringgröße¹.

Nummer der Verbindung	Name der Verbindung	Peptidsequenz	Cy/Hy
1	Phe₇-PLP-SNAC (Referenz)	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	1.0
17	In-Ala₄-Phe₇-PLP-SNAC	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Ala ₄ -Pro ₅ -Papa ₆ -Pip ₇ -Phe ₈ -SNAC	0.4
18	Del-D-Abu₃-Phe₇-PLP-SNAC	HPA ₁ -Thr ₂ -Pro ₃ -Papa ₄ -Pip ₅ -Phe ₆ -SNAC	0.5

HPA, 3-Hydroxy-Picolinsäure; Abu, 2-Amino-Buttersäure; Papa, 4-Amino-Phenylalanin; Pip, Pipecolinsäure; Del, Deletion; In, Insertion; Cy/Hy, Verhältnis von Zyklisierung zu Hydrolyse.

¹ Die Referenzsequenz ist durch Schattierung hervorgehoben.

4.1.9.4 Variationen des Zyklisierungsnukleophils

Das Zyklisierungsnukleophil L-Thr₂ ist direkt an der Zyklisierungsreaktion beteiligt und daher eine sehr wichtige Position in Bezug auf die Substrattoleranz der SnbDE-Zyklase. Um den Einfluss der Identität des Zyklisierungsnukleophils auf die Zyklisierungseffizienz zu untersuchen, wurde das Substrat **19** synthetisiert, in dem L-Thr₂ gegen das kleinere L-Ser ausgetauscht wurde, dem die β-Methylgruppe des Thr fehlt. Interessanterweise wurde mit diesem Substrat ein im Vergleich zum Referenzsubstrat **1** sechsfacher Anstieg des

Zyklisierungs-zu-Hydrolyse- Verhältnisses beobachtet, was sich möglicherweise durch die geringere sterische Hinderung des Serins im Vergleich zum Threonin erklären lässt (Tab. 4.7). Um zu testen, ob die SnbDE-Zyklase auch in der Lage ist, die Bildung von Makrolaktamen anstelle von Makrolaktonen zu katalysieren, wurde das Substrat **20** synthetisiert, in dem L-2,3-Diamino-Propansäure (Dap) anstelle von Thr an Position 2 und Phe anstelle von Papa an Position 5 enthalten ist. Dap unterscheidet sich von L-Ser durch den Austausch der Hydroxylfunktion des Ser gegen eine Aminogruppe. Der zusätzliche Austausch von Papa₅ gegen Phe₅ in dieser Sequenz wurde nach der Beobachtung an Substrat **23** vorgenommen, dass Substrate, die Phe₅ anstelle von Papa₅ enthalten, effizienter zyklisiert werden (Tab. 4.7). Aus diesem Grund muss das Substrat **20** mit Substrat **23** als Referenz verglichen werden. Für das Substrat **20** wurden in enzymatischen Assays Zyklisierung und Hydrolyse in einem Verhältnis von 3:2 beobachtet. Dies bedeutet, dass die SnbDE-Zyklase in der Lage ist, außer der Makrolaktonisierung auch die Makrolaktamisierung von synthetischen Peptidylthioester-Substraten zu katalysieren (Tab. 4.7).

Tabelle 4.7: Substratspezifität der SnbDE-Zyklase: Variation des Zyklisierungsnukleophils¹.

Nummer der Verbindung	Name der Verbindung	Peptidsequenz	Cy/Hy
1	Phe₇-PLP-SNAC (Referenz)	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	1.0
19	L-Ser₂-Phe₇-PLP-SNAC	HPA ₁ -Ser ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	5.8
20	L-Dap₂-Phe₅-Phe₇-PLP-SNAC	HPA ₁ -Dap ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Phe ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	1.5
23	Phe₅-Phe₇-PLP-SNAC (Referenz für 20)	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Phe ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	2.0

HPA, 3-Hydroxy-Picolinsäure; Abu, 2-Amino-Buttersäure; Papa, 4-Amino-Phenylalanin; Pip, Pípecolinsäure; Dap, 2,3-Diamino-Propansäure; Cy/Hy, Verhältnis von Zyklisierung zu Hydrolyse.

¹ Die Referenzsequenz und Abweichungen von dieser Sequenz in den anderen Substraten sind durch Schattierung hervorgehoben.

4.1.9.5 Kinetische Analyse der Substratspezifität

Um die Substrattoleranz der SnbDE-Zyklase noch detaillierter zu untersuchen, wurden die kinetischen Parameter der enzymatischen Reaktionen des Referenzsubstrats **1**, der Substrate des Ala-Scans (Substrate **9-13**) und der Substrate PA₁-Phe₇-PLP-SNAC (**14**) und Ser₂-Phe₇-PLP-SNAC (**19**) bestimmt (Tab. 4.8). Die erhaltenen K_M -Werte liegen zwischen 1.25 und 4.1 mM. Betrachtet man die katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) der Zyklase mit den unterschiedlichen Substraten, stellt man fest, dass die Substrate **12** und **13**, in denen die Reste an den Positionen 6 und 7 jeweils separat durch Ala ersetzt sind, 3.6-mal langsamer umgesetzt werden als das Referenzsubstrat **1**. Dies zeigt einen starken Einfluss der C-terminalen Reste

auf die Effizienz der Peptidyl-*O*-TE-Intermediatbildung. Alle anderen untersuchten Substrate mit Abweichungen von der Referenzsequenz zeigen vergleichbare oder höhere katalytische Effizienzen als das Referenzsubstrat **1**.

Um einen Vergleich zwischen den kinetischen Parametern der enzymatischen Umsetzung des racemisierungsempfindlichen Substrats **7** und dem Referenzsubstrat **1** zu ermöglichen, wurden die Bildungsgeschwindigkeiten des zyklischen Produkts und des Hydrolysats ausgehend von **1** und einer angereicherten Diastereomerenmischung von **7** ($L\text{-7}/D\text{-7} \approx 95/1$ bestimmt über analytische HPLC) zu Beginn der Reaktion für verschiedene Substratkonzentrationen bestimmt. Die $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte für beide Substrate wurden aus den Anfangssteigungen der resultierenden Michaelis-Menten-Auftragungen ermittelt. Für das Substrat **7** mit dem natürlichen C-Terminus wurde eine fünffach höhere katalytische Effizienz ermittelt als für das Referenzsubstrat **1** (Tab. 4.8).

Tabelle 4.8: Kinetische Parameter der enzymatischen Transformation diverser Substrate¹.

Nummer der Verbindung	Name der Verbindung	Peptidsequenz	Kinetische Parameter für die Gesamtproduktbildung (Summe aus Zyklisierung und Hydrolyse)	
			$k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ (mM ⁻¹ min ⁻¹)	K_{M} (mM)
1	Phe₇-PLP-SNAC (Referenz)	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0.54 ± 0.10	2.70 ± 0.35
7	Phg₇-PLP-SNAC	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phg ₇ -SNAC	2.70 ± 0.17	n.d.
9	D-Ala₃-Phe₇-PLP-SNAC	HPA ₁ -Thr ₂ -DAla ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0.40 ± 0.02	3.31 ± 0.31
10	Ala₄-Phe₇-PLP-SNAC	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Ala ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0.51 ± 0.05	1.68 ± 0.30
11	Ala₅-Phe₇-PLP-SNAC	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Ala ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	1.15 ± 0.10	1.25 ± 0.22
12	Ala₆-Phe₇-PLP-SNAC	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Ala ₆ -Phe ₇ -SNAC	0.16 ± 0.01	4.10 ± 0.45
13	Ala₇-PLP-SNAC	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Ala ₇ -SNAC	0.15 ± 0.01	3.63 ± 0.33
14	PA₁-Phe₇-PLP-SNAC	PA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0.58 ± 0.06	2.57 ± 0.45
19	Ser₂-Phe₇-PLP-SNAC	HPA ₁ -Ser ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0.75 ± 0.06	2.66 ± 0.35

HPA, 3-Hydroxy-Picolinsäure; PA, Picolinsäure; Abu, 2-Amino-Buttersäure; Papa, 4-Amino-Phenylalanin; Pip, Pipecolinsäure; Cy/Hy, Verhältnis von Zyklisierung zu Hydrolyse.

¹ Die Referenzsequenz und Abweichungen von dieser Sequenz in den anderen Substraten sind durch Schattierung hervorgehoben.

4.1.9.6 Der Einfluss der *N*-Methylierungen an Position 5

Interessanterweise wird für das Substrat **Ala₅-Phe₇-PLP-SNAC (11)** im Vergleich zum Referenzsubstrat **1** ein zweifach erhöhter $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert bei einem ähnlichen Zyklisierungs-zu-Hydrolyse-Verhältnis beobachtet (Tab. 4.8). Das Referenzsubstrat unterscheidet sich an dieser Position aus synthetischen Gründen von der natürlichen PI_E-Sequenz im Methylierungsgrad sowohl der *para*-Aminogruppe von Papa₅ als auch der Peptidbindung zwischen den Positionen 4 und 5. Möglicherweise haben diese Abweichungen von der natürlichen Substratsequenz einen negativen Einfluss auf die Geschwindigkeit des Substratumsatzes. Die Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen zeigen jedenfalls, dass Ala₅ im Bezug auf die Produktbildungsgeschwindigkeit ein besserer Ersatz für das im PI_E vorhandene *N*-Methyl-Dmpapa₅ ist als Papa₅, welches an dieser Position im Referenzsubstrat **1** vorhanden ist.

Um den Einfluss einer Dimethylierung der *para*-Aminogruppe von Papa₅ untersuchen zu können, wurde das Substrat **21** mit L-Dmpapa₅ anstelle von Papa₅ synthetisiert und enzymatischen Zyklisierungsassays unterworfen. Wegen der geringen Wasserlöslichkeit dieses Substrats konnten keine Reaktionsgeschwindigkeiten bei Substratkonzentrationen größer als 500 µM erhalten werden, wodurch eine separate Bestimmung von k_{cat} und K_{M} verhindert wurde. Stattdessen wurde der $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert aus der Anfangssteigung einer Michaelis-Menten-Auftragung bestimmt. Das *para*-dimethylierte Substrat **21** zeigt vergleichbare kinetische Parameter und ein vergleichbares Zyklisierungs-Hydrolyse-Verhältnis wie das Referenzsubstrat **1** (Tab. 4.9). Dies bedeutet, dass die fehlende Dimethylierung der *para*-Aminogruppe von Papa₅ in den in dieser Studie verwendeten Substraten keinen negativen Einfluss auf die Zyklisierungseffizienz der enzymatisch katalysierten Reaktion hat.

Um den Einfluss der *N*-Methylierung der Peptidbindung zwischen den Positionen 4 und 5 zu untersuchen, wurden die Peptide ***N*-MePhe₅-Phe₇-PLP-SNAC (22)** und **Phe₅-Phe₇-PLP-SNAC (23)** synthetisiert. **22** und **23** unterscheiden sich nur durch An- und Abwesenheit der *N*-Methylierung der Peptidbindung, weshalb sich **23** als Referenzsubstrat eignet, um den Einfluss dieser Methylierung zu bestimmen. Zur Untersuchung dieses Einflusses wurden die Reaktionsverläufe zweier enzymatischer Assays, die jeweils gleiche Konzentrationen **22** und **23** enthielten, verglichen. Zusätzlich wurden die Zyklisierungs-zu-Hydrolyse-Verhältnisse und die $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werte für die Umsetzung dieser beiden Substrate bestimmt (Abb. 4.10, Tab. 4.9).

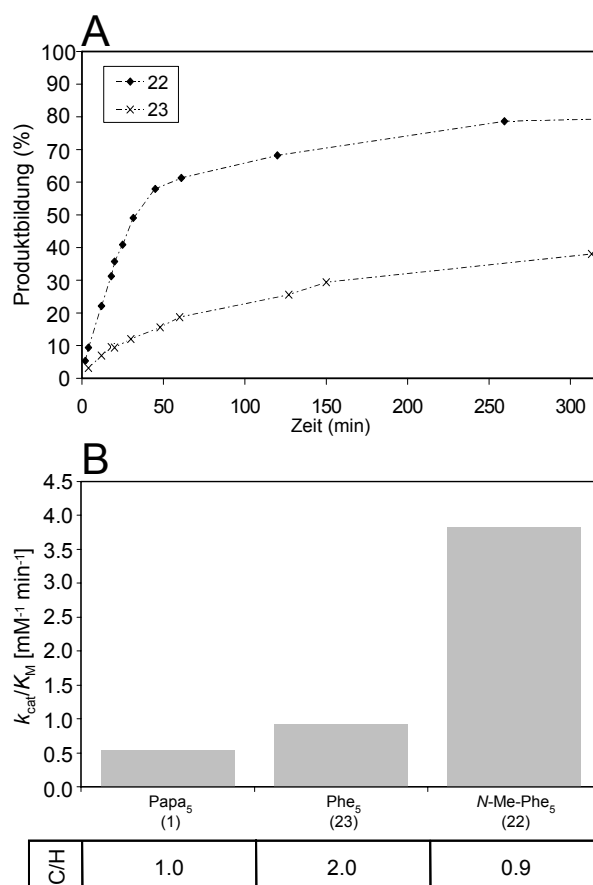


Abbildung 4.10: Einfluss der N-Methylierung der Peptidbindung zwischen den Positionen 4 und 5 auf die katalytische Aktivität.

(A) Zeitlicher Verlauf der Gesamtproduktbildung während einer Inkubation der Substrate *N*-MePhe₅-Phe₇-PLP-SNAC (**22**) und Phe₅-Phe₇-PLP-SNAC (**23**) mit der SnbDE-Zyklase bei 25 °C. Die Anfangskonzentration beider Substrate betrug 350 µM.

(B) Vergleich der kinetischen Eigenschaften und Zyklisierungs-zu-Hydrolyse-Verhältnisse der Substrate **1**, **22** und **23**. Aufgeführt sind die Aminosäurereste an Position 5. C/H = Zyklisierungs-Hydrolyse-Verhältnis.

Tabelle 4.9: Einfluss der Methylierungen an Position 5¹.

Nummer	Name der Verbindung	Peptidsequenz	Cy/Hy	Kinetische Parameter für die Gesamtproduktbildung (Summe aus Zyklisierung und Hydrolyse)	
				k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ min ⁻¹)	K_M (mM)
1	Phe₇-PLP-SNAC (Referenz)	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -PAPA ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	1.0	0.54 ± 0.10	2.70 ± 0.35
21	L-Dmpapa₅-Phe₇-PLP-SNAC	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Dmpapa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0.7	0.88 ± 0.04	n.d.
22	N-MePhe₅-Phe₇-PLP-SNAC	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -N-MePhe ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0.9	3.83 ± 0.25	n.d.
23	Phe₅-Phe₇-PLP-SNAC	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Phe ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	2.0	0.92 ± 0.05	n.d.

HPA, 3-Hydroxy-Picolinsäure; Abu, 2-Amino-Buttersäure; Papa, 4-Amino-Phenylalanin; Dmpapa, 4-*N,N*-Dimethylamino-Phenylalanin; Pip, Picecolinsäure; Cy/Hy, Verhältnis von Zyklisierung zu Hydrolyse.

¹ Die Referenzsequenz und Abweichungen von dieser Sequenz in den anderen Substraten sind durch Schattierung hervorgehoben.

Für das *N*-methylierte Substrat **22** wurde im Vergleich zum nichtmethylierten Substrat **23** ein 4.2-fach erhöhter $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert beobachtet. Im Vergleich zum Referenzsubstrat **1**, das P₅ an Position 5 enthält, steigt der $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert durch die Substitution gegen *N*-MePhe₅ um das 7-fache bei einem vergleichbaren Verhältnis von Zyklisierung zu Hydrolyse. Interessanterweise zeigt das nichtmethylierte Substrat **23** ein ungewöhnlich hohes Zyklisierungs-zu-Hydrolyse-Verhältnis von 2:1 im Vergleich zum Referenzsubstrat **1**.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die *N*-Methylierung der Peptidbindung einen fundamentalen Einfluss auf die Reaktionsrate hat und einen wichtigen Beitrag zur effizienten Zyklisierung durch die SnbDE-Zyklase leistet, während die Anwesenheit der Dimethylierung der *para*-Aminogruppe nur eine untergeordnete Rolle für die Zyklisierungseffizienz spielt.

4.1.10 Zusammenfassung der Charakterisierung der SnbDE-Zyklase

Im ersten Abschnitt des Ergebnisteils ist eine ausführliche Charakterisierung der SnbDE-Zyklase beschrieben worden. Diese Charakterisierung behandelt die Regio- und Stereoselektivität der Zyklisierungsreaktion, die Substratspezifität der SnbDE-TE in Bezug auf Austausch jeder einzelnen Position des Substrat-Peptidrückgrads, eine genauere Untersuchung der Wichtigkeit der einzelnen funktionellen Gruppen der HPA₁ auf die enzymatische Zyklisierungseffizienz, die Toleranz der Zyklase in Bezug auf Verkleinerung oder Vergrößerung des Makrozyklus, eine genaue Untersuchung der Variabilität des Zyklisierungs-nukleophils und die Untersuchung des Einflusses des Methylierungsgrads an Position 5 auf die Zyklisierungseffizienz. Die erhaltenen Zyklisierungs-zu-Hydrolyse-Verhältnisse und die kinetischen Daten, die für die 23 Mitglieder umfassende Substratbibliothek, die für diese Studie synthetisiert wurde, erhalten wurden, fasst die Tabelle 4.10 zusammen.

Tabelle 4.10: Zusammenfassung der Charakterisierung der SnbDE-Zyklase¹.

Nummer	Name der Verbindung	Peptidsequenz	Cy/Hy	Kinetische Parameter für die Gesamtproduktbildung (Summe aus Zyklisierung und Hydrolyse)	
				k_{cat}/K_M (mM ⁻¹ min ⁻¹)	K_M (mM)
1	Phe ₇ -PLP-SNAC (Referenz)	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	1.0	0.54 ± 0.10	2.70 ± 0.35
7	Phg ₇ -PLP-SNAC (PIE-ähnlich)	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phg ₇ -SNAC	2.0	2.70 ± 0.17	n.d.
2	PA ₁ -Ala ₂ -Phe ₇ -PLP-SNAC	PA ₁ -Ala ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0	n.d.	n.d.
3	Ala ₂ -Phe ₅ -Phe ₇ -PLP-SNAC	HPA ₁ -Ala ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Phe ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0	n.d.	n.d.
4	D-Thr ₂ -Phe ₇ -PLP-SNAC	HPA ₁ -D-Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0	n.d.	n.d.
5	L-allo-Thr ₂ -Phe ₇ -PLP-SNAC	HPA ₁ -L-allo-Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0	n.d.	n.d.
6	D-Phe ₇ -PLP-SNAC	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -D-Phe ₇ -SNAC	0	n.d.	n.d.
8	Ac-Ala ₁ -Phe ₇ -PLP-SNAC	Ac-Ala ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0	n.d.	n.d.
9	D-Ala ₃ -Phe ₇ -PLP-SNAC	HPA ₁ -Thr ₂ -D-Ala ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0.6	0.40 ± 0.02	3.31 ± 0.31
10	Ala ₄ -Phe ₇ -PLP-SNAC	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Ala ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	1.7	0.51 ± 0.05	1.68 ± 0.30
11	Ala ₅ -Phe ₇ -PLP-SNAC	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Ala ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0.9	1.15 ± 0.10	1.25 ± 0.22
12	Ala ₆ -Phe ₇ -PLP-SNAC	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Ala ₆ -Phe ₇ -SNAC	1.2	0.16 ± 0.01	4.10 ± 0.45
13	Ala ₇ -PLP-SNAC	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Ala ₇ -SNAC	1.7	0.15 ± 0.01	3.63 ± 0.33
14	PA ₁ -Phe ₇ -PLP-SNAC	PA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0.5	0.58 ± 0.06	2.57 ± 0.45
15	HBA ₁ -Phe ₇ -PLP-SNAC	HBA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0.4	n.d.	n.d.
16	BA ₁ -Phe ₇ -PLP-SNAC	BA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0.4	n.d.	n.d.
17	In-Ala ₄ -Phe ₇ -PLP-SNAC	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Ala ₄ -Pro ₅ -Papa ₆ -Pip ₇ -Phe ₈ -SNAC	0.4	n.d.	n.d.
18	Del-D-Abu ₃ -Phe ₇ -PLP-SNAC	HPA ₁ -Thr ₂ -Pro ₃ -Papa ₄ -Pip ₅ -Phe ₆ -SNAC	0.5	n.d.	n.d.
19	Ser ₂ -Phe ₇ -PLP-SNAC	HPA ₁ -Ser ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Papa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	5.8	0.75 ± 0.06	2.66 ± 0.35
20	Dap ₂ -Phe ₅ -Phe ₇ -PLP-SNAC	HPA ₁ -Dap ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Phe ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	1.5	n.d.	n.d.
21	Dmpapa ₅ -Phe ₇ -PLP-SNAC	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Dmpapa ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0.7	0.88 ± 0.04	n.d.
22	N-MePhe ₅ -Phe ₇ -PLP-SNAC	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -N-MePhe ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	0.9	3.83 ± 0.25	n.d.
23	Phe ₅ -Phe ₇ -PLP-SNAC	HPA ₁ -Thr ₂ -DAbu ₃ -Pro ₄ -Phe ₅ -Pip ₆ -Phe ₇ -SNAC	2.0	0.92 ± 0.05	n.d.

HPA, 3-Hydroxy-Picolinsäure; PA, Picolinsäure; BA, Benzoesäure; HBA, 3-Hydroxy-Benzoesäure; Dap, 2,3-Diamino-Propansäure; Abu, 2-Amino-Buttersäure; Papa, 4-Amino-Phenylalanin; Dmpapa, 4-*N,N*-Dimethylamino-Phenylalanin; Pip, Pipecolinsäure; Cy/Hy, Verhältnis von Zyklisierung zu Hydrolyse.

¹ Die Referenzsequenz und Abweichungen von dieser Sequenz in den anderen Substraten sind durch Schattierung hervorgehoben.

4.2 Biosynthese des (2S,3R)-3-Methyl-Glutamat-Restes der aziden Lipopeptide

Die außergewöhnliche Diversität nichtribosomal synthetisierter Peptide verdankt ihre Existenz dem großen Vorrat an Bausteinen, aus denen diese Naturstoffe zusammengesetzt werden. Neben proteinogenen Aminosäuren beinhaltet dieser D-konfigurierte und weitere nichtproteinogene Aminosäuren sowie verschiedene Karbon- oder Fettsäuren, die häufig am N-Terminus der nichtribosomal synthetisierten Peptide zu finden sind (siehe Abschnitt 1.1). Häufig entstehen die nichtproteinogenen Aminosäuren durch Modifikationen proteinogener Vorläufer. Diese geschehen entweder vor der Aktivierung durch die A-Domänen der nichtribosomalen Peptidsynthetasen, während der nichtribosomalen Peptidsynthese gebunden an das PCP oder nach Abspaltung von der Synthetase als Modifikation am Makrozyklus. Das detaillierte Verständnis der Biosynthese von nichtproteinogenen Aminosäurebausteinen, die für die Bioaktivität der Naturstoffe essentielle Bedeutung haben, ist extrem wichtig, da dies die Grundvoraussetzung für ein Engineering der Biosynthese der Naturstoffe in Bezug auf diese Modifikationen ist.

Die aziden Lipopeptide CDA, Daptomycin und A54145 besitzen als gemeinsames strukturelles Merkmal einen C_β -methylierten Glu-Rest an äquivalenten Positionen des Makrolaktons, der Bedeutung für die Bioaktivität der Verbindungen hat (siehe Abschnitt 1.4). Die folgenden Abschnitte beschäftigen sich mit der biochemischen *in vitro*-Rekonstitution der biosynthetischen Strategie dieser vom chemischen Standpunkt aus betrachtet anspruchsvollen Methylierung einer relativ unreaktiven C_β -Position. Diese Untersuchungen schließen die Charakterisierung der rekombinanten Methyltransferasen GlmT aus *Streptomyces coelicolor*, DptI aus *Streptomyces roseosporus* und LptI aus *Streptomyces fradiae* ein, von denen aufgrund vorausgehender *in vivo*-Ergebnisse bekannt war, dass sie an diesen Modifikationen beteiligt sind (Milne et al., 2006; Nguyen et al., 2006). Außerdem bestimmen die hier beschriebenen Untersuchungen α -Ketoglutarat als das exakte Substrat der Methylierungsreaktion und identifizieren die Aminotransferase IlvE (SCO5523) des Primärstoffwechsels von *Streptomyces coelicolor* als einen effizienten Biokatalysator zur Vervollständigung der 3-MeGlu-Biosynthese. Untersuchungen zur Stereochemie der beiden enzymatischen Transformationen vervollständigen das bisherige Verständnis der Biosynthese und des Einbaus von C_β -methylierten Aminosäuren in nichtribosomale Lipopeptide.

4.2.1 Expression der Methyltransferasen GlmT, DptI und LptI

Die für die Methyltransferasen kodierenden Gene *glmT* aus *Streptomyces coelicolor*, *dptI* aus *Streptomyces roseosporus* und *lptI* aus *Streptomyces fradiae* wurden aus der chromosomalen DNA amplifiziert und in den Expressionsvektor pCB28a(+) kloniert (siehe Abschnitt 3.1). Die Expressionsvektoren wurden verwendet, um die rekombinanten Proteine in *E. coli* als His₆-getaggte Fusionsproteine zu produzieren (GlmT: 38.5 kDa, DptI: 37.4 kDa, LptI: 39.9 kDa), welche dann über IMAC gereinigt wurden. Eine SDS-PAGE-Analyse zeigte eine hohe Reinheit der Proteine (Abb. 4.11). Die Proteinidentität wurde über Massenspektrometrie verifiziert. Aus einem Liter Expressionskultur wurden die folgenden Ausbeuten für die einzelnen gereinigten Proteine erhalten: GlmT: 0.3 mg, DptI: 0.1 mg; LptI: 0.2 mg.

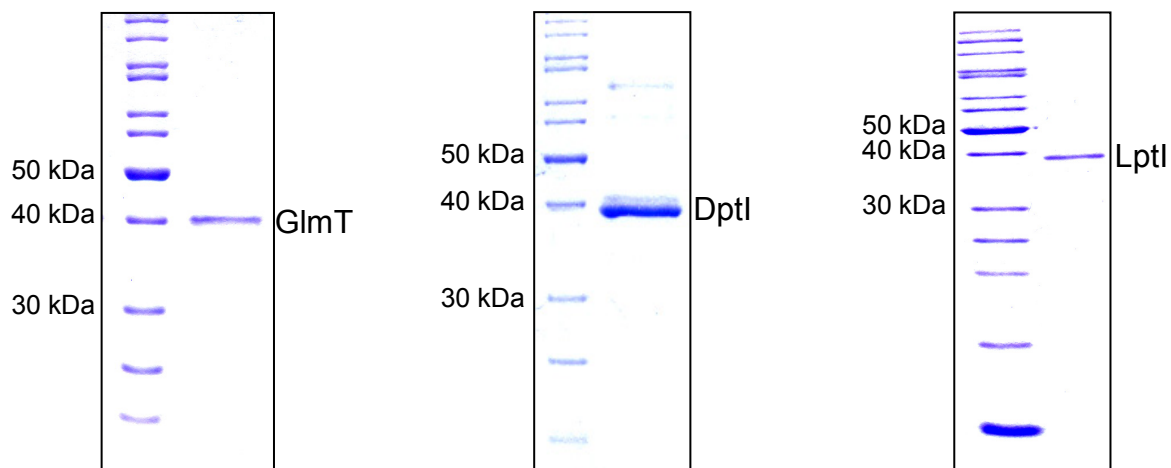


Abbildung 4.11: SDS-PAGE der gereinigten rekombinanten Methyltransferasen.

Die gereinigten ankonzentrierten Methyltransferasen (GlmT: 38.5 kDa, DptI: 37.4 kDa, LptI: 39.9 kDa) wurden einer SDS-PAGE (12 %) unterzogen und mittels Coomassie blue-Färbung visualisiert.

4.2.2 Expression von CDAPSI-PCP10

Das Genfragment *CDAPSI-pcp10* aus *Streptomyces coelicolor*, welches für das PCP des zu 3-MeGlu korrespondierenden Moduls der CDA-Peptidsynthetase 3 (CDAPSI) kodiert, wurde aus der chromosomalen DNA amplifiziert und in den Expressionsvektor pQE-TEV kloniert (siehe Abschnitt 3.1), der einen N-terminalen His₇-Tag in das rekombinante Protein einführt. Das in *E. coli* überproduzierte rekombinante Protein (12.8 kDa) wurde über IMAC gereinigt. Die Reinheit des rekombinanten Proteins wurde über SDS-PAGE analysiert (Abb. 4.12). Die Proteinidentität wurde über Massenspektrometrie bestätigt. Aus einem Liter Expressionskultur wurden 4 mg Protein erhalten.

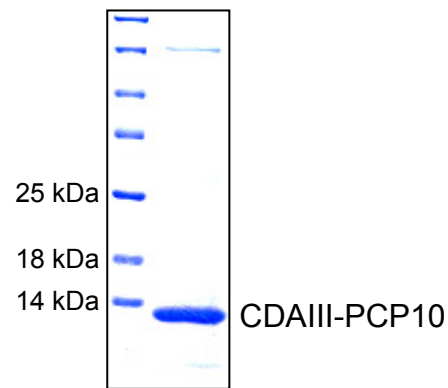


Abbildung 4.12: SDS-PAGE des gereinigten PCP der CDAPSIII.

Das gereinigte ankonzentrierte Protein CDAPSIII-PCP10 (12.8 kDa) wurden einer SDS-PAGE (15 %) unterzogen und mittels Coomassie blue-Färbung visualisiert.

4.2.3 GlmT methyliert weder Glutamat, PCP-gebundenes Glutamat, noch CDA

Sequenz-Abgleiche von GlmT und seinen Homologen DptI und LptI ergaben eine mutmaßliche S-Adenosyl-Methionin (SAM)-Bindungsstelle und zeigten eine Ähnlichkeit zur Ubiquinon-Methyltransferase (UbiE) und anderen SAM-abhängigen Methyltransferasen. Aus diesem Grund wurde vermutet, dass diese Proteine SAM-abhängige Glutamat-3-Methyltransferasen seien, die in einer einstufigen Reaktion direkt die Bildung von 3-MeGlu katalysieren, welches anschließend durch die A-Domäne des korrespondierenden Moduls aktiviert wird (Nguyen et al., 2006). Um die Methylierungsaktivität von GlmT *in vitro* zu untersuchen, wurde das rekombinante Protein mit verschiedenen Substraten in Anwesenheit des Methylgruppenüberträgers SAM inkubiert. In ersten Experimenten wurden L-Glu und D-Glu als die wahrscheinlichsten Methylierungssubstrate getestet. Entgegen der Erwartungen konnte jedoch in HPLC-MS-Analysen kein methyliertes Glu detektiert werden.

Aus diesem Grund wurden als weitere mögliche Substrate L-Glu und D-Glu verwendet, die über die natürliche prosthetische Gruppe Phosphopantethein an das rekombinante PCP von Modul 10 der CDAPSIII gebundenen waren (L-Glu-S-PCP und D-Glu-S-PCP). Die Herstellung dieser Substrate mittels der Phosphopantetheinyl-Transferase Sfp ist in Abschnitt 3.3.3 beschrieben. Über HPLC-MS-Analyse von Inkubationen dieser Substrate mit GlmT und SAM konnte keine Methylierung detektiert werden.

Daher wurde als weitere Möglichkeit ein chemoenzymatisch synthetisiertes (Grünwald et al., 2004b) nichtmethyliertes CDA-Analogon (Abb. 4.13) als Substrat für die Methylierung

untersucht. Auch bei der Analyse von enzymatischen Assays mit diesem Substrat über HPLC-MS konnte keine Methylierung nachgewiesen werden. Unter der Voraussetzung, dass GlmT in den Assays in einer aktiven Form eingesetzt wurde, legen diese Ergebnisse den Schluss nahe, dass die Methyltransferasen der aziden Lipopeptide die Methylierung weder von freiem oder PCP-gebundenem Glu, noch vom Makrozyklus nach Freisetzung von der Synthetase katalysieren (Tab. 4.11).

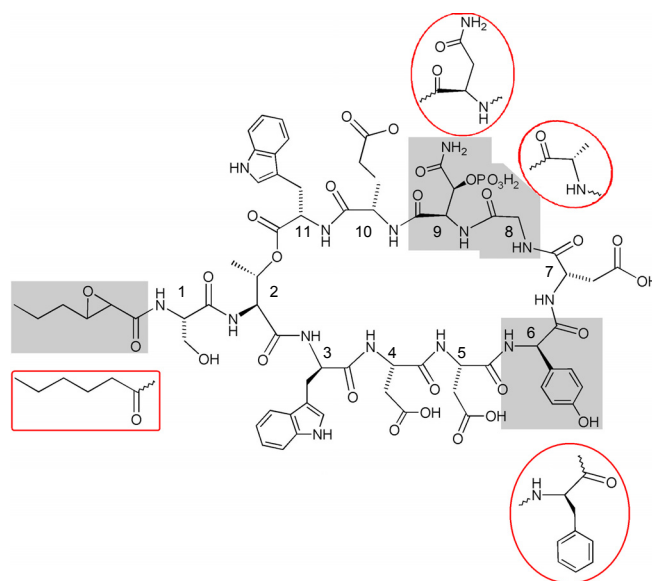


Abbildung 4.13: Chemoenzymatisch synthetisiertes CDA-Analogon.

Vergleich der Struktur des Wildtyp-CDA2b mit dem chemoenzymatisch synthetisierten Analogon. Die ungewöhnlichen Aminosäuren 3-Phospho-Hydroxyasparagin, 3-Hydroxy-Phenylglycin, die N-terminale 2,3-Epoxy-Hexansäure und Glycin (grau hinterlegt) wurden aus Gründen der kommerziellen Erhältlichkeit oder Stabilitätsgründen gegen Asn, Phe, Hexansäure und Ala (rot umrandet) ausgetauscht.

Tabelle 4.11: Ausschluss von möglichen Methylierungssubstraten über HPLC-MS-Analyse¹.

Substrat	Detektierte Spezies	Kalkulierte Masse (Da)	Mögliches Methylierungsprodukt (Da)	Beobachtete Masse nach dem Assay (Da)
L-Glu	[M-H] ⁻	146.0	160.0	146.0
D-Glu	[M-H] ⁻	146.0	160.0	146.0
L-Glu-S-PCP	[M+H] ⁺	13297.1	13311.1	13297.1
D-Glu-S-PCP	[M+H] ⁺	13297.1	13311.1	13297.1
CDA-Analogon	[M+H] ⁺	1467.3	1481.3	1467.3

¹ Ionisierungsmethode: ESI-MS

4.2.4 GlmT, DptI und LptI methylieren α -Ketoglutarat

Aufgrund der Tatsache, dass GlmT nicht in der Lage ist, die Methylierung der zunächst vermuteten Substrate Glu, Glu-S-PCP und CDA zu katalysieren, wurden weitere mögliche Substrate in Erwägung gezogen. Aus zurückliegenden *in vivo*-Studien war bekannt, dass die Fütterung von synthetischem (2*S*,3*R*)-3-MeGlu zu einer Wiederherstellung der Produktion von 3-MeGlu enthaltendem CDA in einer *glmT*-Deletionsmutante von *Streptomyces coelicolor* führt (Milne et al., 2006). Dies zeigt, dass die A-Domäne des Moduls 10 der CDAPSIII in der Lage ist, (2*S*,3*R*)-3-MeGlu zu aktivieren und der CDA-Synthese zuzuführen. Da außerdem GlmT nicht in der Lage ist, PCP-gebundenes Glu oder Glu enthaltende Makrozyklen zu methylieren, gelangt man zu dem Schluss, dass die Methylierung höchstwahrscheinlich vor der Aktivierung durch die A-Domäne stattfindet. Aus diesem Grund wurde sich im weiteren Verlauf der Studie auf mögliche Methylierungsstrategien beschränkt, die zu freiem 3-MeGlu führen.

In einer Analyse des metabolischen Flusses der CDA-Biosynthese wurde vorgeschlagen, dass α -Ketoglutarat (α KG) durch die Katalyse von GlmT methyliert wird, wodurch 3-Methyl-2-Oxoglutarat entsteht, das dann zu 3-MeGlu transaminiert wird (Kim et al., 2004). Um diese Hypothese zu testen, wurde α KG bei 25°C über Nacht mit GlmT und SAM inkubiert. Durch HPLC-MS-Analyse dieses Assays konnte ein quantitativer Umsatz von α KG zu 3-Methyl-2-Oxoglutarat beobachtet werden (Abb. 4.14). Gleiche Ergebnisse wurden ebenfalls für die rekombinanten Methyltransferasen DptI und LptI erhalten. In allen Kontrollassays ohne Methyltransferase oder ohne SAM war keine Methylierung detektierbar.

Diese Experimente zeigen, dass es sich bei GlmT, DptI und LptI um SAM-abhängige Methyltransferasen handelt, die die Umsetzung von α KG zu 3-Methyl-2-Oxoglutarat katalysieren.

Um die enzymatische Methylierung von α KG durch GlmT detailliert zu charakterisieren, wurden die kinetischen Parameter dieser Umsetzung bei einer SAM-Konzentration von 2 mM durch Variation der Substratkonzentration und Abstoppen der Reaktion bei geeigneten Zeitpunkten bestimmt. Die Reaktion folgt einer klassischen Michaelis-Menten-Kinetik. Diese ergaben eine Substrataffinität (K_M) von $62.5 \pm 4.8 \mu\text{M}$, eine Wechselzahl (k_{cat}) von $0.11 \pm 0.002 \text{ min}^{-1}$ und eine katalytische Effizienz (k_{cat}/K_M) von $1.78 \pm 0.17 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$.

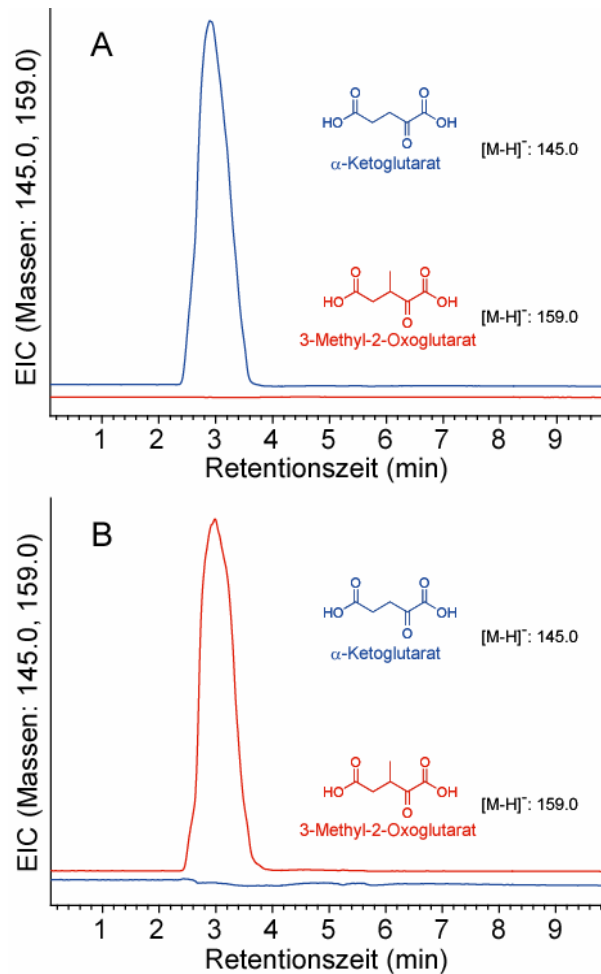


Abbildung 4.14: C_β -Methylierung von α -Ketoglutarat durch GlmT.

SIM-Chromatogramme einer HPLC-MS-Analyse. Die blauen Spuren repräsentieren Screens nach α KG, die roten Spuren repräsentieren Screens nach dem Methylierungsprodukt 3-Methyl-2-Oxoglutarat.

A: Analyse einer Kontrollinkubation ohne Methyltransferase.

B: Analyse einer Inkubation mit GlmT.

4.2.5 GlmT, DptI und LptI zeigen eine hohe Substratspezifität

Um die Substratspezifität von GlmT, DptI und LptI zu bestimmen, wurden fünf kommerziell erhältliche α -Ketosäuren in Anwesenheit von SAM mit den Methyltransferasen inkubiert. HPLC-MS-Analysen dieser Inkubationen (Tab. 4.12) zeigten, dass die drei Methyltransferasen der aziden Lipopeptide hochspezifisch sind und ausschließlich ihr natürliches Substrat α KG akzeptieren.

Tabelle 4.12: Analyse der Substratspezifität von GlmT, DptI und LptI durch HPLC-MS¹.

Substrat	Detektierte Spezies	Kalkulierte Masse (Da)	Mögliches Methylierungsprodukt (Da)	Beobachtete Masse nach dem Assay (Da)
A-Ketoglutarat	[M-H] ⁻	145.0	159.0	159.0
Pyruvat	[M-H] ⁻	87.0	101.0	87.0
Phenylpyruvat	[M-H] ⁻	163.0	177.1	163.0
α -Ketobutyrat	[M-H] ⁻	101.0	115.1	101.0
Oxalacetat	[M-H] ⁻	131.0	145.0	131.0

¹ Ionisierungsmethode: ESI-MS

4.2.6 Transaminierung von 3-Methyl-2-Oxoglutarat

Das nächste Ziel dieser Studie war folglich die Beantwortung der Frage, wie in *Streptomyces coelicolor* das Produkt der Methylierungsreaktion 3-Methyl-2-Oxoglutarat zu 3-MeGlu umgewandelt wird. In den Biosynthesegenclustern für die Produktion der aziden Lipopeptide sind keine konservierten Gene vorhanden, die Proteine kodieren, die Ähnlichkeit zu bekannten Aminotransferasen aufweisen. Aus diesem Grund schien es wahrscheinlich, dass ein außerhalb des Biosynthesegenclusters kodiertes Protein für die Katalyse der Transaminierung von 3-Methyl-2-Oxoglutarat verantwortlich ist. Im Genom von *Streptomyces coelicolor* findet man 77 Gene, die bekannte oder vermutete Aminotransferasen kodieren [<http://streptomyces.org.uk/>]. Einige dieser Enzyme könnten in der Lage sein, die α -Aminogruppe von verschiedenen Aminogruppendonoren auf 3-Methyl-2-Oxoglutarat zu übertragen. Außer diesen Proteinkandidaten könnten auch die NADPH-abhängigen Glutamatsynthasen (SCO1977, SCO2025 und SCO2026) oder die NADP-spezifische Glutamatdehydrogenase (SCO4683) (Fisher, 1989), welche α KG für die Biosynthese von L-Glu als Substrat verwenden, für die Biosynthese von 3-MeGlu aus 3-Methyl-2-Oxoglutarat verantwortlich sein.

Um eine Aminotransferase zu identifizieren, die in der Lage ist, die Transaminierung von 3-Methyl-2-Oxoglutarat zu katalysieren, wurden zunächst fünf kommerziell erhältliche Transaminasen (siehe Abschnitt 3.3.6) durch Inkubation mit synthetischem racemischem 3-Methyl-2-Oxoglutarat, Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP) und einer geeigneten Aminosäure als Aminogruppendonor getestet. HPLC-MS-Analysen dieser Reaktionsmischungen ergaben, dass in Anwesenheit von L-Val die verzweigtkettige-Aminosäure-Transaminase IlvE aus bakterieller Quelle (Sigma) die Bildung von 3-MeGlu aus 3-Methyl-2-Oxoglutarat katalysieren kann. In *Streptomyces coelicolor* ist das Enzym, das durch das Gen SCO5523 kodiert wird, am ähnlichsten zu IlvE. Aus diesem Grund wurde dieses Enzym als möglicher

Kandidat für die Katalyse der Transaminierung von 3-Methyl-2-Oxoglutarat zu 3-MeGlu ausgewählt. Die folgenden Abschnitte beschreiben eine diesbezügliche Charakterisierung dieses Proteins.

4.2.6.1 Expression der Aminotransferase IlvE aus *Streptomyces coelicolor*

Das für die Aminotransferase kodierende Gen *ilvE* (SCO 5523) aus *Streptomyces coelicolor* wurde aus der chromosomalen DNA amplifiziert und in den Expressionsvektor pCB28a(+) kloniert (siehe Abschnitt 3.1.1). Der Expressionsvektor wurde verwendet, um das rekombinante Protein IlvE (40.8 kDa) in *E. coli* als N-terminal His₆-getaggttes Fusionsprotein überzuproduzieren, welches dann über IMAC gereinigt wurde. Eine SDS-PAGE-Analyse ergab eine hohe Reinheit des präparierten Proteins (Abb. 4.15). Die Proteinidentität wurde über Massenspektrometrie verifiziert. Aus einem Liter Expressionskultur wurden 6 mg gereinigte Aminotransferase erhalten.

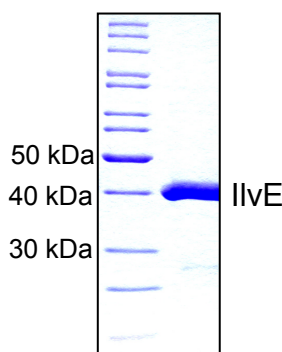


Abbildung 4.15: SDS-PAGE der gereinigten rekombinanten Aminotransferase IlvE aus *S. coelicolor*. Das gereinigte ankonzentrierte Protein (40.8 kDa) wurde einer SDS-PAGE (12.5 %) unterzogen und mittels Coomassie blue-Färbung visualisiert.

4.2.6.2 Transaminierung von synthetischem 3-Methyl-2-Oxoglutarat durch IlvE aus *S. coelicolor*

Um die Fähigkeit der rekombinanten Transaminase IlvE, 3-Methyl-2-Oxoglutarat zu 3-MeGlu umzusetzen, zu testen, wurde sie in der Anwesenheit von L-Val mit synthetischem racemischem 3-MeGlu inkubiert. Eine HPLC-MS-Analyse dieser Reaktionsmischung zeigte die Bildung von 3-MeGlu (Abb. 4.16).

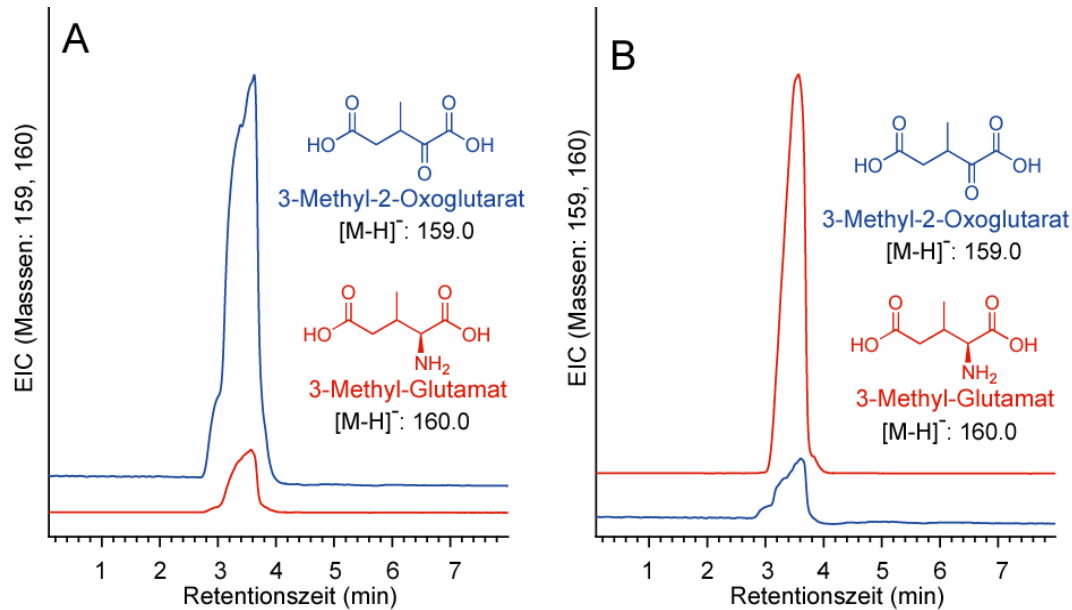


Abbildung 4.16: Transaminierung von synthetischem razemischem 3-Methyl-2-Oxoglutarat durch rekombinantes IlvE aus *S. coelicolor*.

SIM-Chromatogramme von HPLC-MS-Analysen. Die blauen Spuren repräsentieren Screens nach 3-Methyl-2-Oxoglutarat, die roten Spuren repräsentieren Screens nach dem Transaminierungsprodukt 3-MeGlu.

A: Analyse einer Kontrollinkubation ohne IlvE. Der Peak in der roten Spur zeigt nicht die Anwesenheit von unkatalysiert gebildetem 3-MeGlu, sondern repräsentiert einen Isotopenpeak von 3-Methyl-2-Oxoglutarat.

B: Analyse einer Inkubation mit IlvE. Eine Umwandlung von 3-Methyl-2-Oxoglutarat zu 3-MeGlu mit 90 % Ausbeute ist erkennbar. Für die Ausbeuteberechnung wurden die unterschiedlichen Ionisierungseffizienzen berücksichtigt (siehe Abschnitt 3.3.7) sowie die Flächenintegrale der Produktpeaks um den Beitrag der theoretischen Isotopenmenge von 3-Methyl-2-Oxoglutarat korrigiert.

Dieses Ergebnis zeigt, dass IlvE aus dem Primärmetabolismus von *S. coelicolor* in der Lage ist, 3-Methyl-2-Oxoglutarat zu 3-MeGlu umzuwandeln.

4.2.6.3 Gekoppelter Methylierungs-Transaminierungs-Assay

Für eine komplette *in vitro*-Synthese von 3-MeGlu wurden die beobachteten katalytischen Aktivitäten der Methyltransferase GlmT und der Aminotransferase IlvE aus *S. coelicolor* kombiniert und ein gekoppelter Methylierungs-Transaminierungsassay etabliert. Im ersten Schritt wurde αKG durch Inkubation mit GlmT und SAM quantitativ methyliert. Nach Abtrennung der Methyltransferase durch eine Methanolfällung wurde das lyophilisierte Produkt (250 μM) in Transaminierungspuffer gelöst und mit IlvE (8 μM) und dem Aminogruppendonor L-Val für 15 min bei 25 °C inkubiert. Nach einem weiteren Lyophilisierungsschritt wurden die Reaktionsprodukte in wässriger NaHCO₃ (0.15 M, pH 9.0) gelöst und mit Dabsylchlorid derivatisiert. Diese Derivatisierung verbessert die Retention und ermöglicht die Trennung von 3-MeGlu-Diastereomeren durch RP-HPLC (Kim und Kim, 2001; Milne et al., 2006). Eine HPLC-MS-Analyse der Reaktionsmischung ergab eine nahezu

quantitative Umsetzung von 3-Methyl-2-Oxoglutarat zu 3-MeGlu (Abb. 4.17). Die stereochemische Analyse dieses Produkts ist Thema des nächsten Abschnitts.

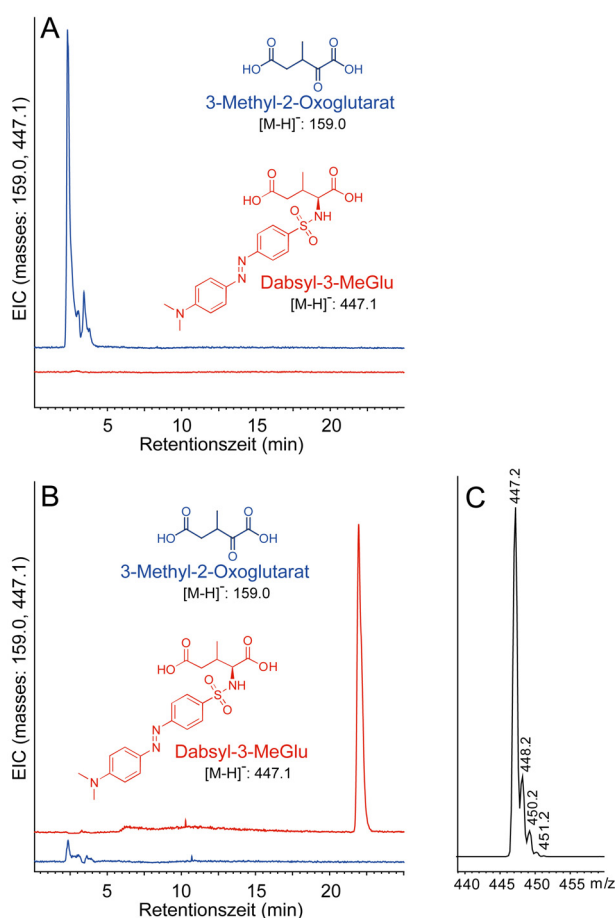


Abbildung 4.17: IlvE-katalysierte Umsetzung von enzymatisch gebildetem 3-Methyl-2-Oxoglutarat .

A und B: SIM-Chromatogramme von HPLC-MS-Analysen von dabsylierten Transaminierungsassays. Die blauen Spuren repräsentieren Screens nach 3-Methyl-2-Oxoglutarat, die roten Spuren repräsentieren Screens nach dabsyliertem 3-MeGlu.

A: Analyse einer Kontrollinkubation ohne IlvE.

B: Analyse einer Inkubation mit IlvE. Ein nahezu quantitativer Umsatz von 3-Methyl-2-Oxoglutarat zu 3-MeGlu ist erkennbar.

C: ESI-MS-Analyse von enzymatisch hergestelltem Dabsyl-3-MeGlu ($[M-H]^-$ kalkuliert: 447.14). Während dieser Analyse wurde das Massenspektrometer im Scan-Modus betrieben.

Um den IlvE-katalysierten Umsatz von 3-Methyl-2-Oxoglutarat zu 3-MeGlu detaillierter zu untersuchen, wurden die kinetischen Parameter dieser Reaktion bei einer konstanten Konzentration des Aminogruppendonors L-Val (5 mM) bestimmt, indem die Substratkonzentration variiert wurde und die enzymatischen Reaktionen zu geeigneten Zeitpunkten abgestoppt wurden. Diese Untersuchungen ergaben einen K_M von 0.196 ± 0.040 mM, einen k_{cat} von 12.1 ± 0.9 s⁻¹ und einen k_{cat}/K_M von 3716 ± 557 min⁻¹ mM⁻¹.

4.2.6.4 Stereospezifität der gekoppelten enzymatischen Reaktion

Um die absolute Konfiguration des durch den gekoppelten Methylierungs-Transaminierungsassay gebildeten Produkts zu ermitteln, wurde die Reaktionsmischung des Transaminierungsassays mit Dabsyl-Chlorid derivatisiert. Eine HPLC-MS-Analyse dieser Mischung ergab eine Koelution des enzymatisch hergestellten dabsylierten 3-MeGlu mit synthetischem dabsyliertem (2*S*,3*R*)-3-MeGlu ($t_R = 9.8$ min). Zu der Retentionszeit, die mit synthetischem dabsyliertem (2*S*,3*S*)-3-MeGlu ($t_R = 10.2$ min) korreliert, war in der enzymatischen Probe kein 3-MeGlu detektierbar (Abb. 4.18).

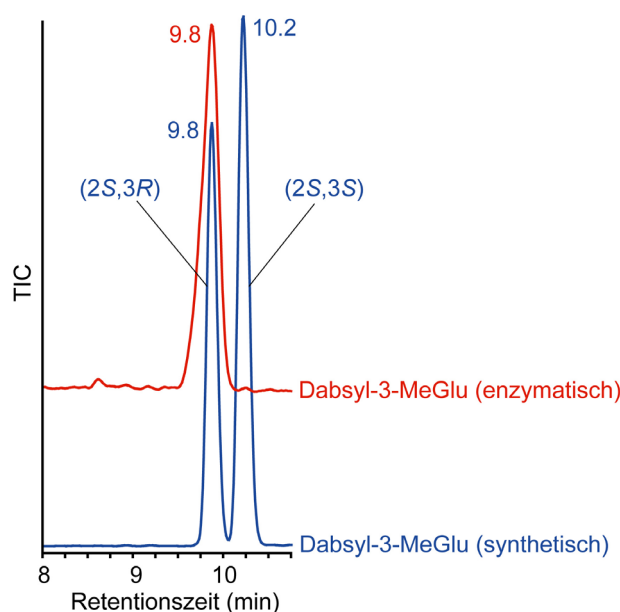


Abbildung 4.18: Bestimmung der absoluten Konfiguration des enzymatisch hergestellten 3-MeGlu.

Total-Ion-Chromatogramme von HPLC-MS-Analysen.

Blaue Spur: HPLC-MS einer Mischung von dabsylierten synthetischen (2*S*,3*R*)- und (2*S*,3*S*)-3-MeGlu-Diastereomeren. Das (2*S*,3*R*)-3-MeGlu ($[M+H]^+$: 449.2 (449.1 berechnet)) eluiert bei $t_R = 9.8$ min.

Rote Spur: HPLC-MS des dabsylierten enzymatisch produzierten 3-MeGlu. Bei $t_R = 9.8$ min ist ein Peak erkennbar ($[M+H]^+$: 449.2 (449.1 berechnet für Dabsyl-3-MeGlu)), der mit dem synthetischen dabsylierten (2*S*,3*R*)-Diastereomer koeluiert. Im Chromatogramm des enzymatischen Produkts sind bei $t_R = 10.2$ min, der Retentionszeit des (2*S*,3*S*)-Diastereomers, keine Produkte detektierbar, deren Molekülonen zu dabsyliertem 3-MeGlu passen.

Um zu zeigen, dass es sich bei dem enzymatischen Produkt tatsächlich um (2*S*,3*R*)-3-MeGlu handelt und nicht um das dazu enantiomere (2*R*,3*S*)-3-MeGlu, das auf einer achiralen HPLC bei derselben Retentionszeit koeluiert, wurde im nächsten Schritt die Stereospezifität der rekombinanten Aminotransferase IlvE untersucht. Gewöhnlich katalysieren die verzweigtkettigen Aminosäure-Transaminasen des Primärstoffwechsels ausschließlich die Bildung von L-Aminosäuren (Goto et al., 2003). Um auszuschließen, dass IlvE aus

S. coelicolor außer L- auch D-Aminosäuren produziert, wurde die Rückreaktion der Glutamatbildung aus α KG untersucht (Abb. 4.19 A). D-Glu (2mM) und L-Glu (2 mM) wurden separat mit IlvE (5 μ M) und dem Aminogruppenakzeptor 3-Methyl-2-Oxobutyrat (250 μ M), der zu Val korrespondierenden α -Ketosäure, über Nacht inkubiert. Nach einer Dabsylderivatisierung der Reaktionsmischungen wurden diese über HPLC-MS analysiert (Abb. 4.19). Die Transaminierung von Glu zu α -Ketoglutarat unter Verbrauch von 3-Methyl-2-Oxobutyrat und der Bildung von Val ist nur in Inkubationen mit L-Glu, nicht aber in solchen mit D-Glu beobachtbar. Dieses Ergebnis zeigt die ausschließliche Spezifität von IlvE für L-Aminosäuren.

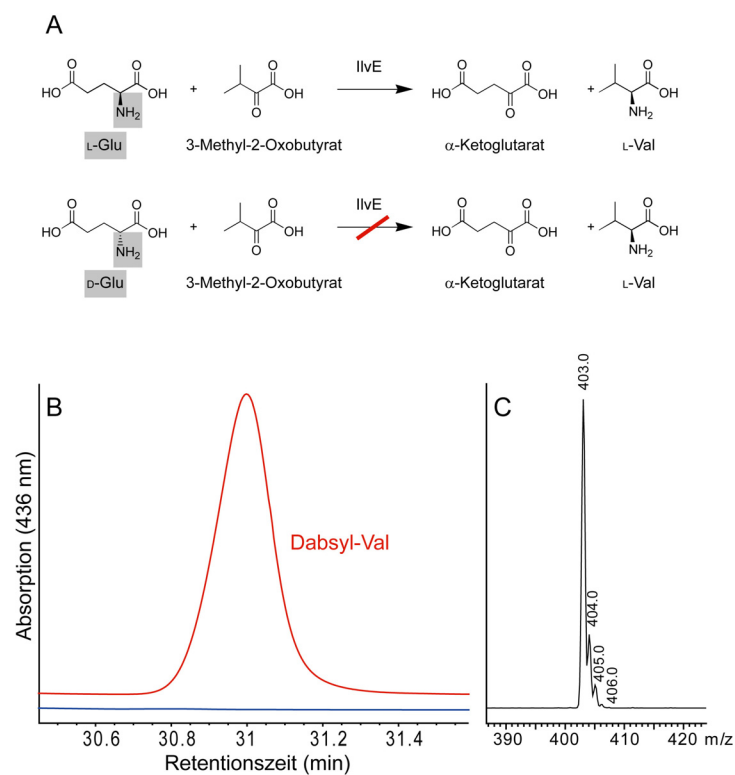


Abbildung 4.19: Bestimmung der Stereospezifität von IlvE aus *S. coelicolor*.

HPLC-MS-Analyse von separaten Inkubationen von L- und D-Glu mit IlvE und 3-Methyl-2-Oxobutyrat.

A: Reaktionsgleichungen zu den vorgenommenen Inkubationen. Nur mit L-Glu findet eine Transaminierung statt. B: Überlagerung zweier HPLC-Chromatogramme der dabsylierten Inkubationen. Blaue Spur: HPLC einer Inkubation mit D-Glu. Rote Spur: HPLC einer Inkubation mit L-Glu. In der roten Spur ist bei einer Retentionszeit $t_R = 31$ min die Entstehung eines neuen Peaks erkennbar. Eine MS-Analyse (C) dieses neuen Produkts identifizierte es als Dabsyl-Val ($[M-H]^+$ berechnet: 403.1). Diese Masse war in Inkubationen mit D-Glu nicht detektierbar.

Vor dem Hintergrund dieses Ergebnisses ist durch den Retentionsvergleich des enzymatisch gebildeten dabsylierten 3-MeGlu mit den synthetischen dabsylierten Standards seine (2*S*,3*R*)-Konfiguration eindeutig bewiesen.

5 Diskussion

Die Modifizierung von Naturstoffen ist eine vielversprechende Strategie auf der Suche nach neuen Wirkstoffen mit verbesserten Aktivitäten. Das Verständnis der Naturstoffbiosynthese ist dabei von großer Bedeutung, weil die *in vitro*-Verwendung der enzymatischen Synthesewerkzeuge in vielen Fällen die chemische Synthese von Naturstoffanaloga erleichtert. Außerdem ist die Kenntnis der Biosynthesestrategien bestimmter struktureller Details eines Naturstoffs die Voraussetzung für ein Engineering der Biosynthese zur fermentativen Produktion neuer Wirkstoffe.

In dieser Arbeit wurde die enzymatische *in vitro*-Aktivität der rekombinanten Pristinamycin I-Zyklase SnbDE-TE aus *Streptomyces pristinaespiralis* untersucht und in Bezug auf ihre katalytischen Eigenschaften charakterisiert. In dieser Diskussion soll ihr synthetisches Potential für die Produktion neuer Streptogramin B-Derivate dargestellt werden.

Weiterhin wurde im Verlauf dieser Arbeit der Biosyntheseweg des 3-MeGlu-Restes der aziden Lipopeptide aufgeklärt. Der zweite Teil der Diskussion vergleicht die Strategie der Methylierung des Glutamats mit anderen Modifikationsmechanismen von Naturstoffbausteinen und diskutiert das Potential, das sich aus diesem Biosyntheseweg für ein Engineering der aziden Lipopeptide ergibt.

5.1 Die Enzymologie der SnbDE-Zyklase

In der Natur katalysiert die C-terminale Pristinamycin-Zyklase der Peptidsynthetase SnbDE die Bildung eines verzweigt-zyklischen peptidischen Makrolaktons durch den intramolekularen nukleophilen Angriff des L-Thr₂-Restes auf das C-terminale L-Phg₇ des TE-gebundenen Acyl-Hexapeptidyl-Oxoesters. In dieser Studie wurden 23 verschiedene Peptidyl-SNAC-Substrate mit der rekombinanten SnbDE-Zyklase umgesetzt, um basierend auf der Sequenz des vereinfachten Referenzsubstrats **Phe₇-PLP-SNAC (1)** (Tab. 4.10) die Charakteristika der Zyklisierungsreaktion und die Substrattoleranz der Zyklase zu untersuchen. Die Sequenz von **1** unterscheidet sich aus synthetischen Gründen von dem natürlicherweise durch die NRPS-Synthese produzierten Pristinamycin I_E an zwei Positionen des Peptidrückgrats (Abb. 4.2). Die SnbDE-Zyklase ist in der Lage, dieses synthetische Substrat *in vitro* zu zyklisieren. Bei dieser Zyklisierung tritt als gleichberechtigte

Nebenreaktion Hydrolyse des Thioester-Substrats auf (siehe Abb. 4.3 und Tab. 4.10). Die folgenden Abschnitte fassen die gefundenen Ergebnisse bezüglich der Stereo- und Regioselektivität sowie der Substrattoleranz der SnbDE-TE katalysierten Zyklisierung zusammen und vergleichen sie mit den Eigenschaften von bekannten Zyklisierungsreaktionen, die durch andere rekombinante Zyklastasen katalysiert werden.

5.1.1 Die Stereoselektivität der SnbDE-TE

Die Stereoselektivität der SnbDE-TE wurde in dieser Arbeit in Bezug auf die C-terminale Aminosäure Phe₇ und das Zyklisierungsnukleophil Thr₂ der Referenzsequenz des Substrats **1** untersucht. Zu diesem Zweck wurde die Zyklastase mit den Substraten **D-Thr₂-Phe₇-PLP-SNAC (4)**, **L-*allo*-Thr₂-Phe₇-PLP-SNAC (5)** und **D-Phe₇-PLP-SNAC (6)** inkubiert (siehe Tab. 4.10 und Abb. 4.5). Dass kein Substratumsatz beobachtet wurde, zeigt die ausgeprägte Stereoselektivität für beide in der Zyklisierung involvierten Reste. Während eine Veränderung der Stereochemie des Zyklisierungsnukleophils zu einer starken Hydrolyse der Thioester-Substrate führt, verhindert eine Veränderung der Stereochemie der C-terminalen Aminosäure sowohl die Zyklisierung als auch die Hydrolyse. Dies zeigt die Wichtigkeit der Stereochemie der C-terminalen Aminosäure für die Ausbildung des Peptidyl-*O*-TE-Intermediats. Eine hohe Stereoselektivität für das Nukleophil wurde auch in Peptidzyklisierungen mit der Tyrocidin-, der CDA- und der Syringomycin-Zyklastase beobachtet und ist möglicherweise eine generelle Eigenschaft der NRPS-Thioesterasedomänen (Grünwald et al., 2004b; Sieber et al., 2004; Trauger et al., 2000).

5.1.2 Die Regioselektivität der SnbDE-TE

Die Aminosäuresequenz des Referenzsubstrats **1** enthält drei mögliche Zyklisierungsnukleophile: Die Hydroxylgruppe der HPA₁, die Hydroxylgruppe des natürlichen Zyklisierungsnukleophils Thr₂ und die im natürlichen Pristinamycin I_E eigentlich dimethylierte Aminogruppe des Papa₅ (siehe Abb. 4.2). Um die Regioselektivität der SnbDE-TE in Bezug auf diese drei Nukleophile zu untersuchen, wurde die Zyklastase mit den Substraten **PA₁-Ala₂-Phe₇-PLP-SNAC (2)** und **Ala₂-Phe₅-Phe₇-PLP-SNAC (3)** inkubiert, die jeweils nur eines der beiden unnatürlichen Zyklisierungsnukleophile enthalten (Abb. 4.4). Beide Substrate wurden ausschließlich hydrolysiert, es war keine Zyklisierung detektierbar. Dies zeigt eine hohe Regioselektivität der SnbDE-TE katalysierten Makrolaktonisierung. Dieses

Ergebnis ist wichtig für synthetische Anwendungen der SnbDE-TE, da es eine enzymatische Zyklisierung erlaubt, ohne die alternativen Nukleophile mit Schutzgruppen versehen zu müssen. Hohe Regioselektivitäten bei der Zyklisierungsreaktion wurden auch für andere Zyklastasen beobachtet: Die Fengycin-TE beispielsweise katalysiert eine regioselektive Zyklisierung über Tyr₃, trotz der Anwesenheit der beiden weiteren Nukleophile Orn₂ und Thr₃ (Sieber et al., 2003). Die CDA-Zyklase zeigt ebenfalls trotz Anwesenheit des benachbarten Ser₁ eine hohe Regioselektivität in Bezug auf das Zyklisierungsnukleophil Thr₂. Interessanterweise geht diese Regioselektivität aber verloren, wenn die N-terminale Fettsäure von sechs C-Atomen (Hexansäure) auf zwei C-Atome (Essigsäure) verkürzt wird. In diesem Fall entstehen zwei regioisomere Produkte, die über die Zyklisierung über Thr₂ bzw. Ser₁ gebildet werden (Grünwald et al., 2004b).

5.1.3 Veränderungen des Zyklisierungsnukleophils

Die strukturelle Ähnlichkeit zwischen Ser und Thr ermöglicht der SnbDE-TE, auch L-Ser₂ anstelle von L-Thr₂ als Zyklisierungsnukleophil zu akzeptieren (Substrat **19**, Tab. 4.10). Interessanterweise steigt das Zyklisierungs-zu-Hydrolyse-Verhältniss mit diesem Substrat im Vergleich zum Referenzsubstrat **1** um das sechsfache an (Tab. 4.10). Dies kann durch eine niedrigere sterische Hinderung während des nukleophilen Angriffs auf die C-terminale Aminosäure erklärt werden, die durch das Fehlen der β -Methylgruppe des Thr beim Ser zustande kommt. Diese Interpretation wird durch einen nach einem Austausch der C-terminalen Aminosäure Phe₇ gegen Ala₇ beobachteten Anstieg des Zyklisierungs-zu-Hydrolyse-Verhältnisses unterstützt (Substrat **13**, Tab. 4.10.): Auch dieser Austausch hat eine Verminderung der sterischen Hinderung zwischen den Reaktionspartnern der Zyklisierung zur Folge, wodurch die Zyklisierung begünstigt wird. Allerdings sinkt der $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Wert durch solch einen Austausch deutlich (Tab. 4.10). Diese Beobachtungen zeigen, dass sowohl die sterische Hinderung zwischen den reagierenden Resten als auch die Erkennung der C-terminalen Aminosäure durch die Zyklastase für die Zyklisierungseffizienz von Bedeutung sind.

Interessanterweise ist die SnbDE-TE auch in der Lage, eine Makrolaktamisierung zu katalysieren, was durch den Austausch der Hydroxylgruppe des Ser₂ gegen eine Aminogruppe gezeigt werden konnte (Substrat **20**, Tab. 4.10). Andere Beispiele für Zyklastasen, die Makrolaktone und Makrolaktame ausbilden können, sind die Tyrocidin-TE und die A54145-TE (Kopp et al., 2006a; Trauger et al., 2001). Die Surfactin-TE, die natürlicherweise eine Makrolaktonisierung katalysiert, ist nicht in der Lage, mit Surfactin-analogen Substraten

Makrolaktame zu bilden (Tseng et al., 2002). Allerdings ergaben Surfactin-TE-Mutationsstudien, dass durch Substitution der Aminosäure Ala81 mit dem zusätzlichen Wasserstoffbrücken-Donor Serin die Katalyse einer Makrolaktamisierung möglich wird (Wagner, 2006). Die SnbDE-TE war zum Zeitpunkt ihrer Charakterisierung die erste Zyklase eines Makrolakton-bildenden NRPS-Systems, die zusätzlich auch als Makrolaktam-Bildner genutzt werden kann, und die erste Zyklase, die *in vitro* verzweigt-zyklische Makrolaktame bilden kann.

5.1.4 Bildung von Zyklen verschiedener Ringgröße

Die erfolgreiche Zyklisierung der Insertions- und Deletionsvarianten **17** und **18** (Tab. 4.10) zeigt, dass die SnbDE-Zyklase in der Lage ist, die Bildung von Makrozyklen mit variabler Ringgröße zu katalysieren, wenn auch mit einem verminderten Zyklisierungs-zu-Hydrolyse-Verhältnis. Diese Beobachtung stimmt mit Ergebnissen überein, die mit der Tyrocidin-TE erhalten wurden. Diese Zyklase ist in der Lage, Peptide von 6, 8, 10, 12 und 14 Resten Länge zu zyklisieren (Kohli et al., 2001). Die Bildung von Makrolaktonen verschiedener Ringgrößen konnte auch für die A54145-TE und die Daptomycin-TE gezeigt werden (Kopp et al., 2006a). Auch die iterativ arbeitende Zyklase des Gramicidin S führt über Zyklooligomerisierungen verschieden langer monomerer Peptidylthioester-Substrate zu einer Reihe von Makrozyklen mit unterschiedlichen Ringgrößen (Hoyer et al., 2007).

5.1.5 Einfluss der *N*-methylierten Peptidbindung

Eine charakteristische strukturelle Eigenschaft der S_B -Antibiotika ist die Iminosäure-Triade $\text{Pro}_4 - N\text{-Me-X}_5 - \text{Pip}_6$. Diese Triade ist in den hier verwendeten Substraten aus synthetischen Gründen durch die Verwendung von unmethylierten Aminosäuren an Position 5 unterbrochen worden. Mit dem Substrat **22**, welches $N\text{-MePhe}_5$ anstelle von Papa_5 enthält, konnte ein starker Anstieg der katalytischen Effizienz der Gesamtproduktbildung im Vergleich zum Substrat **23**, welches sich von **22** nur durch das Fehlen der *N*-Methylierung der Peptidbindung zwischen den Positionen 4 und 5 unterscheidet, beobachtet werden (Tab. 4.10). Die *N*-Methylierung dieser Peptidbindung hat also einen starken Einfluss auf die Substraterkennung durch die Zyklase. Möglicherweise lässt sich diese Beobachtung durch abweichende Konformationen der an Position 5 methylierten und nichtmethylierten Peptide erklären: Es gibt zwei Effekte, durch die die *N*-Methylierung einer Peptidbindung die Konformation des Substrats beeinflussen kann: Zum einen kann die Methylierung die

Ausbildung von Wasserstoffbrücken verhindern, und zum zweiten induzieren Iminosäuren wegen ihrer höheren Tendenz, cis-Peptidbindungen auszubilden, häufig Schleifen in den Peptidketten (Sewald und Jakubke, 2002a). Allgemein ist eine Zyklisierung von Peptiden, die kürzer als sieben Aminosäuren sind, ohne Schleifen-induzierende strukturelle Elemente sehr schwierig (Sewald und Jakubke, 2002a). Möglicherweise ermöglicht die fehlende *N*-Methylierung der Peptidbindung zwischen den Positionen 4 und 5 in den hier verwendeten Substraten die Bildung von Sekundärstrukturen, die durch die Zyklase schlecht erkannt werden, oder die Substrate weisen eine Vorfaltung auf, die ungünstig für die Zyklisierungsreaktion ist.

Ein beeindruckendes Beispiel für die Wichtigkeit der Vorfaltung eines Peptids für die Zyklisierung ist das Nostocyclopeptid, das durch das Cyanobactrium *Nostoc* sp. ATCC53789 produziert wird. Beim Nostocyclopeptid handelt es sich um ein peptidisches zyklisches Imin. Die Abspaltung des Peptids von der dazugehörigen Peptidsynthetase geschieht durch eine Reduktasedomäne, deren Katalyse zur Freisetzung eines reaktiven Peptidaldehyds führt. Die intrinsische Konformation dieses Aldehyds bewirkt eine zyklische Vororientierung der Peptidkette, die zu einer selbständigen unkatalysierten Makrozyklisierung führt (Kopp et al., 2006b).

5.1.6 Substrattoleranz der SnbDE-TE

Die Untersuchung des synthetischen Potentials der SnbDE-TE, die Zyklisierung von S_B -Derivaten zu katalysieren, deren Struktur von der natürlichen Pristinamycin I_E -Struktur abweicht, zeigte eine hohe Substrattoleranz. Ein systematischer Ala-Scan (Substrate **8-13**, Tab. 4.10) mit einer genaueren Untersuchung der Position 1 (Substrate **14-16**, Tab. 4.10) ergab keine Beschränkungen für Austausch irgendeiner Position, außer der Notwendigkeit eines aromatischen Restes an Position 1. Allerdings reduzieren Variationen dieses Restes und des Restes an Position 3, die beide das Zyklisierungs-nukleophil Thr₂ umschließen, das Zyklisierungs-zu-Hydrolyse-Verhältnis. Die katalytische Effizienz der Produktbildung ist bei den meisten Austauschen gegen Ala vergleichbar zu den Werten des Referenzsubstrats **1**, nur bei Veränderungen der C-terminalen Positionen 6 und 7 wird eine deutliche Abnahme des k_{cat}/K_M -Werts beobachtet. Dies lässt auf eine schlechtere Erkennung durch die Zyklase und somit auf eine langsamere Ausbildung des Peptidyl-*O*-TE-Intermediats schließen. Ein gegenteiliger Effekt wird beobachtet, wenn Papa₅ gegen Phe₅ oder Ala₅ ausgetauscht wird (Substrate **23** und **11**). Dann erhöht sich die katalytische Effizienz, und im zweiten Fall verdoppelt sich das Zyklisierungs-zu-Hydrolyse-Verhältnis. Dass dieser Effekt damit

zusammenhängt, dass Papa₅ im Referenzsubstrat **1** ein schlechter Ersatz für Dmpapa₅ sein könnte, das in der Natur an dieser Stelle vorliegt, kann ausgeschlossen werden, da ein Dmpapa₅ enthaltendes Substrat (Substrat **21**, Tab. 4.10) ähnliche kinetische Parameter und ein ähnliches Zyklisierungs-zu-Hydrolyse-Verhältnis aufweist wie das Referenzsubstrat **1**. Die Position 5 zeigt also eine ausgeprägte Toleranz für Aminosäure-Austausche, und Phe₅, wie es im Virginiamycin S aus *Streptomyces virginiae* vorkommt, ist die optimale Aminosäure an dieser Position. Zusammenfassend zeigen die beschriebenen Ergebnisse, dass neben der *N*-Methylierung hauptsächlich die Reste um das Zyklisierungsnukleophil und um den C-Terminus zur Substratspezifität beitragen (Abb. 5.1) Hingegen werden Veränderungen der Reste in der Mitte des Substrats von der Zyklase ohne nennenswerte Ausbeuteverluste toleriert. Diese Ergebnisse stimmen gut mit Untersuchungen der Substrattoleranz der Tyrocidin-TE und der Surfactin-TE überein (Trauger et al., 2000; Tseng et al., 2002).

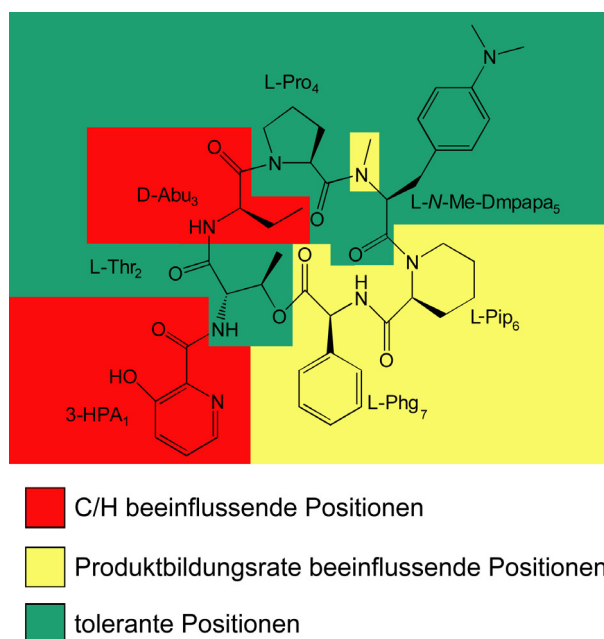


Abbildung 5.1: Zusammenfassende Darstellung der Substrattoleranz der SnbDE-TE.

Gezeigt ist die Strukturformel von Pristinamycin I_E. Rot hervorgehobene Positionen führen bei struktureller Veränderung zu einer Abnahme des Zyklisierungs-zu-Hydrolyse-Verhältnisses. Gelb hervorgehobene Positionen führen bei Veränderung zu einer Abnahme der katalytischen Effizienz der TE-katalysierten Gesamtproduktbildung. Grün hervorgehobene Positionen können strukturell verändert werden, ohne die Zyklisierungseffizienz zu beeinträchtigen. Ein Austausch von Dmpapa₅ zu Phe₅ führt sogar zu einer verbesserten katalytischen Effizienz und zu einem verbesserten Zyklisierungs-zu-Hydrolyse-Verhältnis.

5.2 Die SnbDE-Zyklase als Werkzeug zur Synthese von Streptogramin B-Derivaten

5.2.1 Synthetische Herausforderungen bei der Streptogramin B-Synthese

Die große Bedeutung der Streptogramin-Antibiotika und die Entwicklung von Resistenzen gegen diese Moleküle erklärt die Anstrengungen der letzten Jahrzehnte, natürliche Streptogramine und Streptogramin-Varianten über chemische Synthese zugänglich zu machen. Die Synthese von S_B-Molekülen ist recht anspruchsvoll: Die homochirale *N*-Alkyl-Aminosäuretriade Pro₄ – *N*-MeDmpapa₅ – 4-Oxo-Pip₆ ist empfindlich gegen starke Säuren (Anteunis und Van der Auwera, 1988), der Phg₇-Ester ist empfindlich gegen Epimerisierung und Eliminierung (Shaginian et al., 2004), und *des-N*-Hydroxy-Picolinsäure-S_B-Moleküle neigen zu Umlagerungen, die zu inaktiven Makrolaktam- und Oxazolin-Nebenprodukten führen (Barriere et al., 1998a). Ein generelles Problem der Synthese von zyklischen Peptiden ist der regio- und stereospezifische Ringschluss ohne Razemisierung der C-terminalen aktivierten Aminosäure (Benoiton et al., 1992; Bordusa, 2001). Wegen all dieser Schwierigkeiten wurden viele S_B-Varianten durch chemische Modifikation der vorhandenen Naturstoffe hergestellt, was von Barriere et al. zusammengefasst wurde (Barriere et al., 1998b). Diese Modifikationen umfassen Derivatisierungen oder Austausche des HPA-Restes und Funktionalisierungen der Dmpapa- und 4-Oxo-Pip-Reste an verschiedenen Stellen. Die wichtigste Modifikation an letzterem Rest ist die Generierung der Synercid-Komponente Quinupristin.

Um Struktur-Aktivitäts-Beziehungen der S_B-Antibiotika detailliert untersuchen zu können, sind *de novo*-Synthesen dieser Moleküle und von Varianten unumgänglich. Die erste Totalsynthese von natürlichen S_B-Molekülen wurde 1986 von Kessler et al. beschrieben (Kessler et al., 1986b), doch es wurden schon zuvor Synthesen von Varianten durchgeführt, und es folgten weitere Totalsynthesen (Kessler et al., 1986a; Ondetti und Thomas, 1965; Robinson et al., 2004). Alle diese Synthesen nutzen aufwendige Strategien, um die Razemisierung des Phg-Esters und die Zersetzung der *N*-Alkyl-Aminosäuretriade zu umgehen. Im Jahr 2004 wurde die Festphasensynthese des S_B-Antibiotikums Dihydrovirginiamycin S publiziert (Shaginian et al., 2004). In dieser Studie wird eine aufwendige Synthesestrategie vorgestellt, die die beschriebenen Probleme durch einen optimierten Satz von Schutzgruppen und Kupplungs- und Entschützungsbedingungen in einer

18-stufigen Synthese umgeht. Mit dieser Strategie ist die Synthese von Varianten mit Diversifikation an den Positionen 1, 2, 3, 4, 5 und 7 möglich. Lediglich die 4-Hydroxy-Pipecolinsäure an Position 6 ist invariant, da über deren Hydroxylgruppe die Kupplung ans Harz erfolgt.

Zusammenfassend machen die beschriebenen Syntheseprobleme aufwendige Strategien nötig, um über chemische Synthese S_B -Substanzbibliotheken zu generieren, die wichtige Hilfsmittel auf der Suche nach verbesserten S_B -Molekülen wären. Eine einfache Lösung dieser Probleme über einen neuen chemoenzymatischen Ansatz, der die katalytischen Eigenschaften der SnbDE-TE ausnutzt, ist Thema des nächsten Abschnitts.

5.2.2 Dynamische Kinetische Resolution als Vereinfachung der Streptogramin B-Synthese

Ein Hauptproblem der Streptogramin B-Synthese ist die Razemisierung des C-terminalen Phg₇. Für die Charakterisierung der SnbDE-TE wurden daher hauptsächlich Substrate mit C-terminalem Phe₇ verwendet, welches razemisierungsresistent ist. Die SnbDE-TE zeigt eine ausgeprägte Selektivität für L-Phe₇- gegenüber D-Phe₇- enthaltenden Substraten. Diese Ergebnisse führten zu dem Versuch, durch Inkubation mit der SnbDE-TE aus einer Diastereomerenmischung des razemisierungsempfindlichen Peptidsubstrats L-Phg₇-PLP-SNAC (**2**) selektiv den natürlichen L-Phg₇ enthaltenden Zyklus zu generieren. Die Bildung nur eines zyklischen Produkts, für welches L-Konfiguration des C-Terminus nachgewiesen werden konnte, zeigt die erfolgreiche SnbDE-TE vermittelte kinetische Resolution (KR). Die Beobachtung einer *in situ*-Epimerisierung der beiden Substratdiastereomere von **2** macht diese KR synthetisch noch wertvoller: Die stetige Entfernung der L-Phg₇-enthaltenden Substrate durch die Zyklase zieht das Razemisierungsgleichgewicht auf die Seite der natürlichen Substrate, wodurch auch die unnatürlichen D-Phg₇-enthaltenden Substrate nach und nach zum natürlichen L-Phg₇-enthaltenden Zyklus abreagieren. Dieser ist im Gegensatz zu den Substraten razemisierungsresistent. Die Kombination der durch die Stereoselektivität der Zyklase entstehenden KR mit der *in situ*-Razemisierung der Substrate erfüllt die Bedingungen einer dynamischen kinetischen Resolution (DKR) (Turner, 2004) (Abb. 5.2). Im Prinzip können durch einen solchen Prozess beide Diastereomere des Ausgangsmaterials mit hoher Ausbeute und optischer Reinheit in das gewünschte Produkt überführt werden, wodurch die allgemeine Limitierung einer 50%-Ausbeute aus einer

Substratdiastereomerenmischung überwunden wird. Die einzigen beobachteten Nebenprodukte sind D- und L-Phg₇ enthaltenden Hydrolysate.

Die beobachtete DKR verleiht der SnbDE-TE eine hohe synthetische Bedeutung. Die S_B-Synthese vereinfacht sich durch die beschriebene Strategie zu einer Standard-Peptidfestphasensynthese mit nachfolgender enzymatischer Zyklisierung. Die DKR erlaubt die Verwendung von Säuren und Basen in Kupplungs- und Entschützungsprotokollen, ohne auf die Razemisierungsempfindlichkeit des Phg₇ Rücksicht nehmen zu müssen. Lediglich auf die Säureempfindlichkeit der N-Alkyl-Aminosäuretriade muss Rücksicht genommen werden. Die Kombination der DKR mit der beobachteten hohen Substrattoleranz der Zyklase macht die SnbDE-TE zu einem leistungsstarken Werkzeug für die Generierung von S_B-Bibliotheken mit unterschiedlich effizienten Variationsmöglichkeiten an allen sieben Positionen des Naturstoffs.

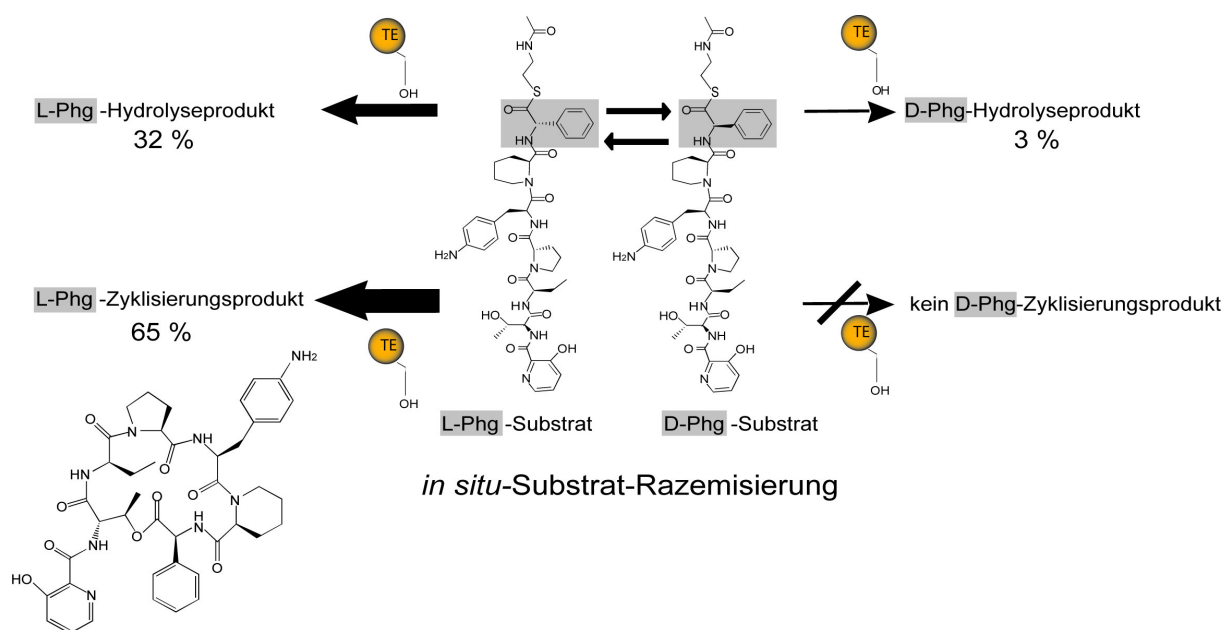


Abb. 5.2: Dynamische kinetische Resolution der Phg₇-PLP-SNAC-Epimere durch die SnbDE-Zyklase.

Die beiden Substratepimere stehen durch eine *in situ*-Razemisierung miteinander im Gleichgewicht. Die SnbDE-Zyklase zyklisiert aus dieser Mischung selektiv das L-Phg₇-Diastereomer. Diese kinetische Resolution ist bei den Hydrolyseprodukten weniger stark ausgeprägt, doch auch hier wird das L-Phg₇-Substrat-Diastereomer zehnfach schneller hydrolysiert. Die Produktbildung geschieht damit in den Verhältnissen 2:1:0.1 (L-Phg₇-Zyklus : L-Phg₇-Hydrolysat : D-Phg₇-Hydrolysat), wodurch das L-Phg₇-Diastereomer 30 mal schneller umgesetzt wird, als das D-Phg₇-Diastereomer. Durch das Gleichgewicht zwischen den Substratdiastereomeren wird das L-Phg₇-Isomer immer wieder nachgebildet, wodurch letztendlich die gesamte Substratmenge in den beschriebenen Verhältnissen in die Produkte überführt wird.

Allgemein sind kinetische Resolutionen aus racemischen Gemischen der häufigste Weg, um enantiomerenreine Verbindungen im industriellen Maßstab herzustellen (Breuer et al., 2004). Besonders enzymatische KRs zeichnen sich oft durch eine hohe Selektivität aus. Um die inhärente Limitierung einer 50%-Ausbeute einer KR zu überwinden, werden in Fällen, wo anders als im Fall der beschriebenen S_B -Zyklisierung keine spontane Substratzemisierung stattfindet, häufig Chemo- oder Biokatalysatoren zugegeben, die die Razemisierung bewerkstelligen und so die KR zu einer DKR aufstocken (Martin-Matute und Backvall, 2007). Beispiele für DKRs, die die Verwendung einer stereoselektiven enzymatischen Umsetzung mit einem die Substratzemisierung katalysierenden Metallkomplex kombinieren, sind Umsetzungen von Allyl-Acetat, Allyl-Alkoholen, sekundären Alkoholen und Aminen (Martin-Matute und Backvall, 2007). Sehr interessante neue Beispiele für eine Verwendung der DKR sind Synthesen von chiralen Polyester-Oligomeren durch iterative Tandem-Katalyse, die von racemischen Estern oder racemischen Diolen ausgehen (Hilker et al., 2006) (Abb. 5.3). Durch moderne Methoden, wie die gerichtete Enzym-Evolution, könnten in Zukunft maßgeschneiderte Biokatalysatoren zur Verfügung stehen, die neue stereoselektive Transformationen katalysieren. Dadurch würde die DKR noch breiter einsetzbar.

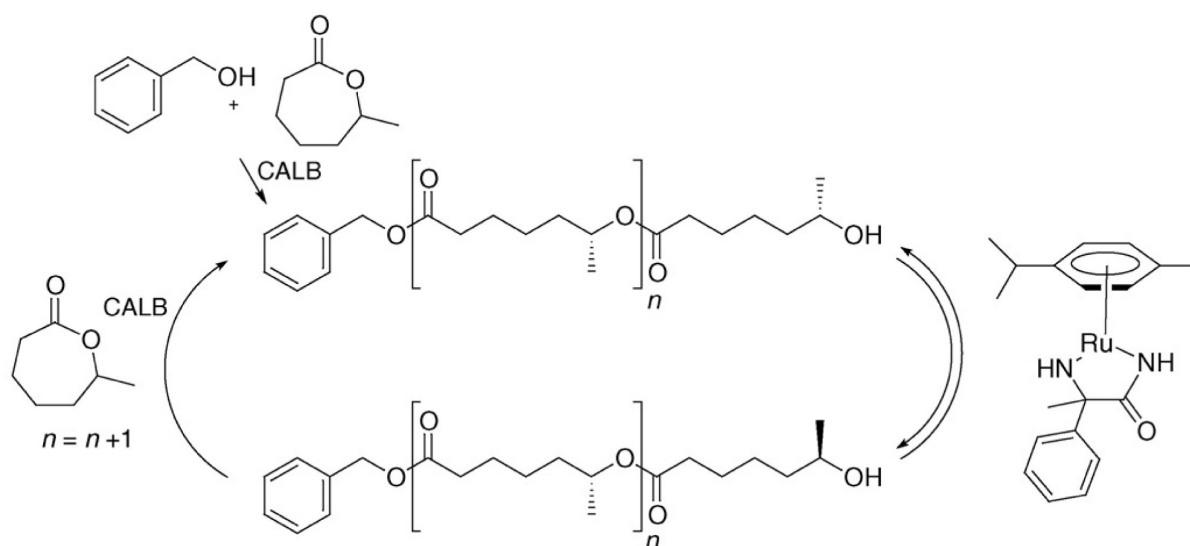


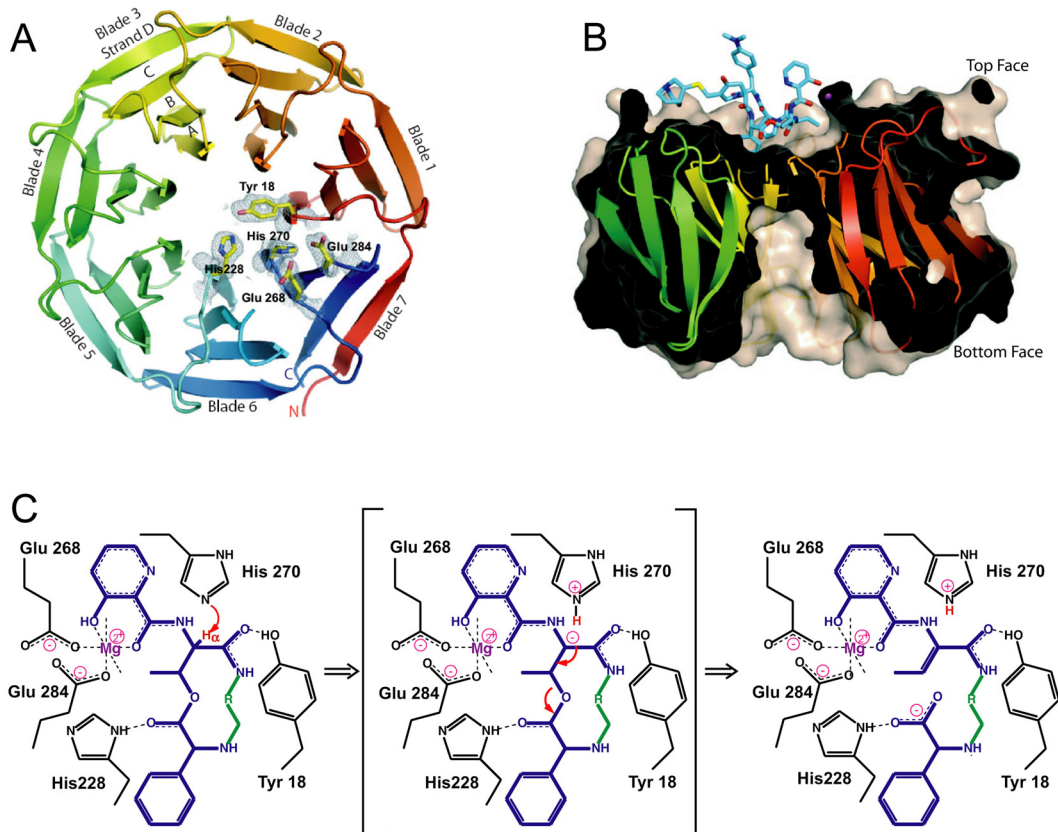
Abb. 5.3: Synthese eines chiralen Polyester-Oligomers ausgehend von einem racemischen Ester (Hilker et al., 2006) (aus Martin-Matute und Backvall, 2007).

CALB: *Candida antarctica* Lipase B

5.2.3 Design von verbesserten Streptogramin B-Varianten

5.2.3.1 Umgehung von Resistenzen gegen Streptogramin B-Antibiotika

Obwohl die Streptogramin-Antibiotika erst seit kurzer Zeit Verwendung als Arzneimittel in der Klinik finden, sind viele Resistenzmechanismen gegen beide Komponenten beobachtet worden, was wahrscheinlich auf den jahrzehntelangen Gebrauch dieser Verbindungen in der Tiermast zurückzuführen ist. Diese Entwicklung schränkt die Anwendbarkeit von Synercid als therapeutische Alternative gegen lebensbedrohliche bakterielle Infektionen mehr und mehr ein. Um neue auf den natürlichen Streptograminen basierende Antibiotika entwickeln zu können, die die auftretenden Resistenzen umgehen, ist es wichtig, die Resistenzmechanismen gegen die Streptogramine genau zu verstehen. Bisher wurden gegen die Streptogramine drei verschiedene resistenzvermittelnde Mechanismen beobachtet: die aktive Ausschleusung aus der Zelle durch spezifische Transporter, die Modifizierung des Angriffsziels, und die Inaktivierung der Antibiotika (Mukhtar und Wright, 2005). Der wichtigste Resistenzmechanismus gegen S_B-Moleküle in pathogenen Bakterien ist die Inaktivierung durch die Virginiamycin B-Lyase (Vgb-Lyase), die zunächst für eine Hydrolase gehalten wurde. Dieses Enzym wurde das erste Mal in einem klinischen Isolat von *Staphylococcus aureus* beschrieben (Le Goffic et al., 1977). Die Lyase, die später als rekombinantes Protein charakterisiert wurde, spaltet die konservierte S_B-Lakton-Funktion zwischen Thr₂ und Phg₇ durch einen Eliminierungsmechanismus (Mukhtar et al., 2001). Durch diese Reaktion wird die Laktonfunktion durch eine anti-Eliminierung zwischen dem C_α- und dem C_β-Atom des Threonins gespalten, wodurch am Thr eine Z-Doppelbindung generiert wird (Abb. 5.4). Bedauerlicherweise wurden in vielen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien zur Vgb-Lyase orthologe Proteine gefunden (Mukhtar et al., 2001). Diese Verbreitung der S_B-resistenzvermittelnden Proteine könnte den klinischen Nutzen der S_B-Antibiotika empfindlich beeinträchtigen. Vor kurzem wurde die Kristallstruktur der Vgb-Lyase aus *Staphylococcus aureus* in der apo-Form und einer mutierten Variante in Komplex mit Quinupristin und Mg²⁺ gelöst (Korczynska et al., 2007). In Kombination mit Mutationsanalysen konnte dadurch der genaue Mechanismus dieses Enzyms und seine Interaktionen mit den S_B-Molekülen verstanden werden (Abb. 5.4).



5.4: Struktur und Mechanismus der Vgb-Lyase aus *Staphylococcus aureus* (aus Korczynska et al., 2007).

A: Sicht entlang der zentralen Achse. Die fünf Reste des aktiven Zentrums sind hervorgehoben.

B: Um 90° um die zentrale Achse rotierte Ansicht. Die Ansicht ist ein Querschnitt durch das Zentrum, und macht die Vertiefung auf der Oberseite und den Tunnel auf der Unterseite sichtbar. Auch das in der Vertiefung bindende Quinupristin ist gezeigt.

C: Vorgeschlagener Reaktionsmechanismus. Nur der für die Reaktion wichtige Teil des Quinupristins ist gezeigt, der Rest des Makrozyklus ist durch den grünen Bereich (R) angedeutet.

Die Struktur der Vgb-Lyase besteht aus einer siebenblättrigen β -Propeller-Faltung. Die Gestalt des Enzyms ähnelt einem Donut, dessen Loch durch einen Ring von aromatischen Resten geschlossen ist, wodurch auf der einen Seite eine Mulde von 8 Å Tiefe und auf der anderen Seite ein Tunnel von 20 Å Tiefe entsteht. In der Mulde liegt das aktive Zentrum der Lyase. Die konservierten Reste Tyr-18, His-228, Glu-268 und Glu-284 gehen mit dem gebundenen Quinupristin und dem durch die Hydroxy-Picolinsäure, Glu-268 und Glu-284 koordinierten Mg^{2+} -Kation ein Netzwerk von katalytisch wichtigen Interaktionen ein (Abb. 5.4). Die katalytisch aktive Base His-270 deprotoniert das C_{α} -Atom des Thr, was durch Mg^{2+} und Tyr-18 erleichtert wird. Anschließend bildet sich eine Doppelbindung zwischen dem C_{α} - und dem C_{β} -Atom des Thr aus, wobei die Esterbindung gespalten wird. Diese Reaktion wird durch die Interaktion der Phg-Carbonylgruppe mit His-228 erleichtert. Der

katalytische Zyklus endet durch eine Regenerierung des His-270-Restes, der sein Proton an die Carboxylgruppe des austretenden linearen Produkts oder Wasser abgibt.

Die durch die Kokristallisation erhaltenen strukturellen Daten eröffnen die Möglichkeit, der Vgb-vermittelten S_B-Resistenz gezielt entgegenzuwirken. Dies kann entweder durch die Entwicklung von Vgb-Lyase-Inhibitoren oder durch das Design von neuen S_B-Antibiotika geschehen, die von der Vgb-Lyase nicht erkannt werden und gleichzeitig ihre antibiotische Aktivität behalten. Das aktive Zentrum der Vgb-Lyase bindet die S_B-Antibiotika hauptsächlich durch schwache Van-der-Waals-Interaktionen, weshalb ein Inhibitor eine möglichst große Oberfläche haben müsste, was zu hohen Molekulargewichten führen würde. Diese Gründe erschweren die Synthese eines spezifischen Inhibitors (Korczynska et al., 2007). Als die Kristallstruktur der Vgb-Lyase noch unbekannt war, wurden auf der Suche nach Vgb-Lyase-resistenten S_B-Varianten Pristinamycin-Derivate hergestellt, in denen die Esterbindung durch eine Amidbindung ersetzt war (Mukhtar et al., 2005). Diese Derivate sollten durch die Vgb-Lyase nicht gespalten werden, aber noch antibakterielle Aktivität aufweisen. Zur Synthese dieser Derivate wurde eine enzymatische Zyklisierung von S_B-Tyrocidin-Chimeren durch die TycC-TE genutzt. Diese Chimeren enthielten Reste, die für die Erkennung durch die TycC-TE wichtig sind (Trauger et al., 2000) und Reste, die für die Interaktion der Streptogramine mit dem Ribosom wichtig sind (Harms et al., 2004). Interessanterweise zeigen die gebildeten chimeren Makrolaktame *in vivo* antibakterielle Aktivität und werden durch die Vgb-Lyase nicht inaktiviert. Jedoch konnte gezeigt werden, dass diese Antibiotika keinen synergistischen Effekt zu Dalfopristin aufweisen und nicht in der Lage sind, ein *in vitro*-Translationssystem zu inhibieren. Diese Beobachtungen zeigen, dass in dieser Studie eine neue Antibiotikaklasse mit einem unbekannten Wirkungsmechanismus entwickelt wurde. Es ist jedoch anzumerken, dass durch die Strategie von Mukhtar et al. das S_B-Makrolaktam nicht ohne weitere Abweichungen zur S_B-Sequenz hergestellt werden konnte, da die TycC-TE sonst nicht in der Lage gewesen wäre, die Zyklisierung zu katalysieren. In der vorliegenden Arbeit wurde beschrieben, dass die SnbDE-TE in der Lage ist, die Bildung von Streptogramin B-Makrolaktamen zu katalysieren (Abschnitt 4.1.9.4). Daher kann der neu entwickelte chemoenzymatische Ansatz über die DKR nun verwendet werden, um S_B-Makrolaktame herzustellen, die keine weiteren Abweichungen zur natürlichen Sequenz aufweisen. Möglicherweise zeigen diese Derivate Bioaktivitäten, die denen der S_B-Antibiotika ähnlich sind, ohne durch die Vgb-Lyase inaktiviert werden zu können.

Da für die Streptogramin-Antibiotika nun die Kristallstrukturen sowohl in Komplex mit dem natürlichen Wirkungsort als auch mit dem Resistenzfaktor bekannt sind, kann man durch Vergleich der Art und Weise der Interaktionen in beiden Fällen analysieren, welche strukturellen Eigenschaften für die antibiotische Wirkung und welche für die Erkennung durch den Resistenzfaktor wichtig sind (Korczynska et al., 2007) (Abb. 5.5).

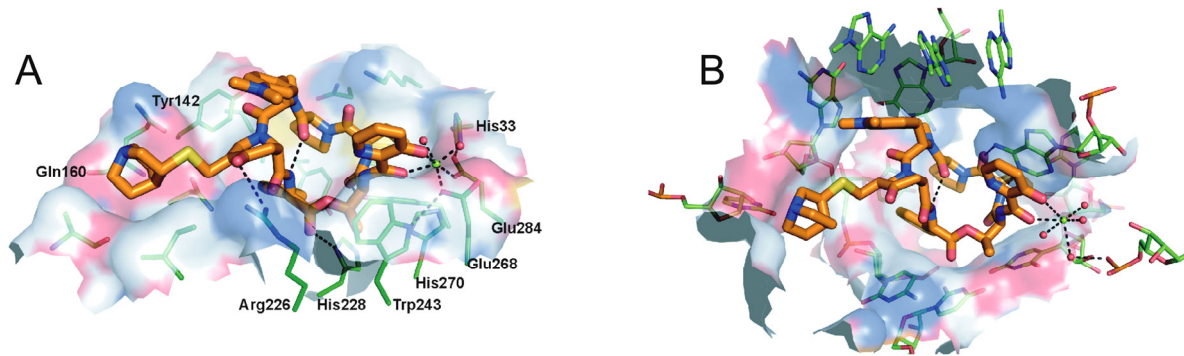


Abb. 5.5: Vergleich zwischen der Bindung von Quinupristin an der Vgb-Lyase (A) und am Ribosom (B) (aus Korczynska et al., 2007).

A: Oberfläche der Vgb-Lyase in 5.5 Å Entfernung vom gebundenen Quinupristin. Die Farben geben die Identität der zugehörigen Atome an: N, blau; O, rot; C, weiß; S, gelb. Weiterhin sind sowohl die Reste gezeigt, die signifikant zur Oberfläche beitragen, als auch das Mg^{2+} -Kation mit den koordinierten Wassermolekülen.

B: Identisches Diagramm für die 50S-ribosomale Untereinheit. Die Ansicht ist so gewählt, dass in beiden Bildern die gleiche Orientierung des Quinupristins zu sehen ist.

Interessanterweise zeigt Quinupristin in beiden Fällen die gleiche Konformation, was auf die Rigidität des Moleküls zurückzuführen ist, die durch eine intramolekulare Wasserstoffbrücke zwischen der α -Aminogruppe des Phg₇ und der Carbonylgruppe des Pro₄ ausgebildet wird. In beiden Strukturen geht Quinupristin neben wenigen Wasserstoffbrücken hauptsächlich Van-der-Waals-Bindungen mit seinen Partnern ein. Über 60 % der Moleküloberfläche sind jeweils daran beteiligt. Die Reste, über die diese Interaktionen verlaufen, sind in beiden Fällen ähnlich, aber nicht identisch: Die Ausnahmen sind der Dmpapa₅-Rest, der nur in der Bindung zum Ribosom eine wichtige Rolle spielt, und der 4-oxo-Pip₆-Rest, der nur an der Bindung zur Vgb-Lyase partizipiert. Diese Beobachtung macht diese beiden Reste zu interessanten Zielen für Veränderungen der Antibiotika. Weitere interessante Reste sind das Phg₇ und das Pro₄, die mit dem Grund der Vertiefung des aktiven Zentrums der Vgb-Lyase interagieren. Möglicherweise würde eine Vergrößerung dieser Reste eine Bindung der Vgb-Lyase verhindern, ohne die Bindung an das Ribosom zu beeinträchtigen. Interessanterweise zeigt die SnbDE-TE für all diese Positionen und besonders für die Positionen 4 und 5 eine gewisse Toleranz (siehe Abschnitt 5.1.6). Der in dieser Arbeit vorgestellte chemoenzymatische Ansatz kann also für ein gezieltes Design von neuen S_B-Antibiotika herangezogen werden, die möglicherweise in der Lage sind, die durch die Vgb-Lyase vermittelte Resistenz zu umgehen.

5.2.3.2 Derivatisierung von S_B-Derivaten über Click-Chemie

Im vorigen Abschnitt wurde auf das rationale Design von neuen resistenzumgehenden S_B-Antibiotika eingegangen. In diesem Abschnitt soll eine Methode vorgestellt werden, wie chemoenzymatisch hergestellte S_B-Substanzbibliotheken weiter modifiziert werden können, um ihre Diversität noch zu erhöhen. Für solch einen Ansatz wären Methoden vorteilhaft, über die verschiedenste Bausteine einfach und selektiv an S_B-Moleküle angehängt werden könnten. Besonders eignen würden sich daher Methoden, die unter dem Begriff der „Click-Chemie“ zusammengefasst sind (Kolb et al., 2001). Unter diesen Methoden spielt die Kupfer(I)-katalysierte [3+2]-Zykloaddition zwischen Aziden und terminalen Alkinen eine besondere Rolle (Rostovtsev et al., 2002). Eines von vielen interessanten Anwendungsbeispielen ist die chemoenzymatische Synthese von zyklischen Glykopeptidantibiotika (Lin und Walsh, 2004): Durch eine TycC-TE vermittelte Zyklisierung von linearen Peptidylthioester-Substraten wurden 13 verschiedene zyklische Tyrocidin-Derivate hergestellt, die ein bis drei Propargylglycin-Reste an den Positionen 3-8 enthielten. Diese Peptide wurden über die genannte „Click-Chemie“-Methode mit 21 verschiedenen Azido-Zuckern verknüpft. In Bioaktivitätsscreens zeigten einige Derivate bei gleicher antibakterieller Wirksamkeit eine geringere hämolytische Aktivität gegen rote Blutkörperchen.

Der gleiche Ansatz könnte auch für die Modifizierung der S_B-Antibiotika verwendet werden (Abb. 5.6). Um den Propargylglycinrest in das S_B-Gerüst einzubauen, eignen sich alle Positionen, für die die S_BDE TE eine hohe Toleranz zeigt. Besonders die Position 5 könnte interessant sein, da sie spezifische Interaktionen mit dem Ribosom eingeht (siehe Abschnitt 5.2.3.1), auch in der Natur eine hohe Variabilität aufweist (siehe Abb. 1.5) und die ribosomale Bindungsstelle an dieser Position genügend Raum für größere angehängte Bausteine lässt (Harms et al., 2004).

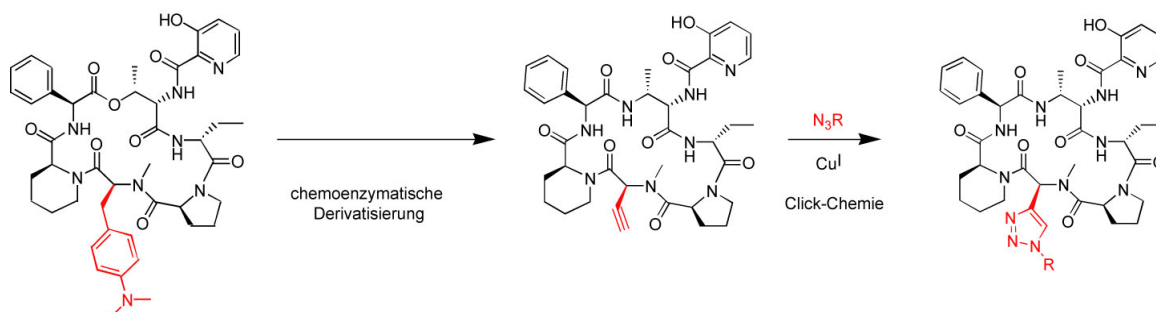


Abb. 5.6: Synthese von modifizierten S_B-Antibiotika über S_BDE-vermittelte chemoenzymatische Einführung eines Propargylglycins und nachfolgende Derivatisierung über Click-Chemie.

R kann für verschiedene Bausteine stehen, z.B. Zucker, Nukleotide oder Aminosäuren.

Auf der Suche nach verbesserten S_B-Antibiotika wäre die Synthese einer breiten S_B-Bibliothek nötig, die dann auf neue oder verbesserte Bioaktivitäten untersucht werden könnte.

5.3 Biosynthese des 3-MeGlu-Restes der aziden Lipopeptide

In den vorigen Abschnitten wurden chemoenzymatische Ansätze diskutiert, mit deren Hilfe man durch die Katalyse von rekombinanten Zyklasen hochdiverse Molekülbibliotheken generieren kann. In der Natur wird strukturelle Diversität von Sekundärmetaboliten neben der großen Vielfalt von NRPS/PKS-Templaten hauptsächlich durch die Aktion von Modifikationsenzymen geschaffen (Walsh et al., 2001). Das mechanistische Verständnis dieser Enzyme ist in Hinsicht auf zweierlei Aspekte von großer Bedeutung: Erstens können rekombinante Varianten solcher Biokatalysatoren *in vitro* für chemisch komplexe Modifikationen herangezogen werden, und zweitens ermöglicht die Kenntnis der biosynthetischen Strategie einer Modifikation ein Engineering, das zur fermentativen Produktion veränderter Sekundärmetabolite mit verbesserten Eigenschaften führen kann. Im Verlauf dieser Arbeit wurde die Biosynthesestrategie des konservierten 3-MeGlu-Restes der aziden Lipopeptide CDA, Daptomycin und A54145 untersucht. Die C_β -Methylierung des Glutamats verleiht allen drei Lipopeptiden eine höhere Bioaktivität, was die Bedeutung dieser Modifikation unterstreicht (siehe Abschnitt 1.4.2). Im Verlauf dieser Diskussion soll die biosynthetische Strategie der C_β -Methylierung des Glutamats mit den Mechanismen anderer C-Methylierungen und weiterer C-Modifikationen verglichen werden.

Allgemein können Modifikationen von durch NRPS oder PKS synthetisierten Sekundärmetaboliten zu verschiedenen Zeitpunkten der Biosynthese stattfinden (Walsh et al., 2001). Die erste Möglichkeit ist die Synthese eines ungewöhnlichen Bausteins, der dann von der A-Domäne erkannt und der NRPS-Synthese zugeführt wird. Ein Nachteil dieser Strategie ist, dass die gebildeten Bausteine, z.B. modifizierte Aminosäuren, mit Enzymen des Primärstoffwechsels, z.B. der Proteinbiosynthese, interagieren können, was z.B. zur fehlerhaften Synthese von Proteinen führen könnte. Die zweite Möglichkeit ist eine Modifizierung eines Bausteins nach der Erkennung und Aktivierung durch die A-Domäne und der Übertragung auf das PCP. Die Kondensation erfolgt erst nach der Modifikation. Die dritte Möglichkeit besteht darin, dass die Modifikation nach Abspaltung des Sekundärmetabolits von der Synthetase stattfindet. Alle diese Möglichkeiten sind in der Natur vertreten und einige davon werden im Verlauf dieser Diskussion vorgestellt.

5.3.1 SAM-abhängige Methyltransferasen

Da die C_β -Methylierung des Glutamats während der Biosynthese der aziden Lipopeptide unter Beteiligung einer SAM-abhängigen Methyltransferase abläuft, soll hier zunächst eine kurze Einführung in diese Proteine gegeben werden. Allgemein sind SAM-abhängige Methyltransferasen an verschiedensten Prozessen, wie z.B. Biosynthese, Signaltransduktion, Proteinreparatur, Chromatinregulation und Gensuppression beteiligt. Nach ATP ist SAM das am häufigsten genutzte Enzymsubstrat überhaupt (Cantoni, 1975). Das Substratspektrum der Methyltransferasen reicht von kleinen Molekülen über Proteine bis zur DNA, wobei die Methylierung von Stickstoff-, Sauerstoff-, Schwefel-, Kohlenstoff- und sogar Halogen-Atomen möglich ist (Attieh et al., 1995). Die meisten durch SAM-abhängige Methyltransferasen katalysierten Reaktionen laufen als direkter Transfer der aktivierten Methylgruppe nach einem S_N2 -Mechanismus ab (Schubert et al., 2003). Dieser Mechanismus verlangt die Abstraktion eines Protons von dem zu methylierenden Atom vor, während oder nach dem Methyltransfer. Unter den verschiedenen Methyltransferasen wurden vielfältige Mechanismen zur Aktivierung des Nukleophils gefunden, die von der jeweiligen Polarisierbarkeit des Zielatoms abhängen. Die Methylierung von C-Atomen, die per se eine geringe Nukleophilie aufweisen, erfolgt häufig über die intermediäre Ausbildung von stabilisierten Carbanionen, wofür im Verlauf dieser Diskussion noch einige Beispiele gezeigt werden. Ein interessantes Beispiel für eine C-Methylierung außerhalb des Sekundärmetabolismus ist die von der DNA C5-Cytosin Methyltransferase M.HhaI katalysierte Methylierung von Cytosin. In dieser Reaktion wird das Nukleotid durch Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen dem Thiol eines in den C5-Cytosin-Methyltransferasen konservierten Cys-Restes und dem Kohlenstoffatom C6 aktiviert (Wu und Santi, 1987) (Abb. 5.7). Dadurch wird eine negative Ladung am C5 generiert, die den nukleophilen Angriff auf die Methylgruppe des SAM ermöglicht.

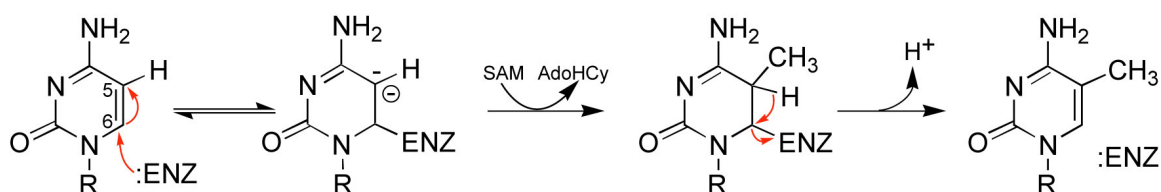


Abb. 5.7: katalytischer Mechanismus der Cytosin-C5-Methylierung durch die M.HhaI-Methyltransferase.

Strukturell werden die SAM-abhängigen Methyltransferasen in fünf verschiedene Klassen aufgeteilt (Schubert et al., 2003). Der größte Teil der bekannten Enzyme gehört der Klasse 1 an. Die erste Kristallstruktur einer SAM-abhängigen Methyltransferase wurde 1993 für die oben erwähnte DNA C5-Cytosin Methyltransferase M.HhaI gelöst (Cheng et al., 1993). Mehrere Jahre lang wurde für weitere Methyltransferasen, die verschiedenste Substrate methylieren, dieselbe Grundstruktur gefunden (Martin und McMillan, 2002). Sie besteht aus einem siebensträngigen β -Faltblatt mit einer charakteristischen β -Haarschleife am C-terminalen Ende. Dieses Faltblatt ist von α -Helices flankiert, wodurch ein doppelt gewundenes offenes $\alpha\beta\alpha$ -Sandwich entsteht, das als Klasse 1 Methyltransferase-Struktur bezeichnet wird (Abb. 5.8).

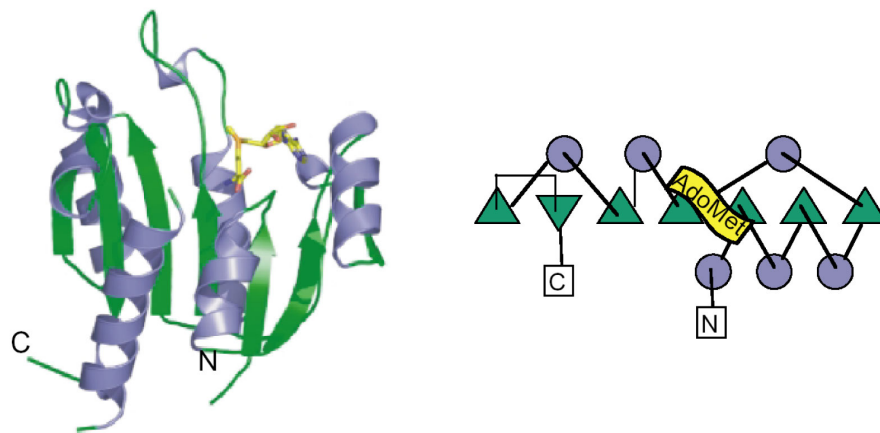


Abb. 5.8: Tertiärstruktur der SAM-abhängigen Methyltransferasen der Klasse 1 am Beispiel der DNA C5-Cytosin Methyltransferase M.HhaI (aus Schubert et al., 2003).

Links: Tertiärstruktur; rechts: topologisches Diagramm. Gelb: S-Adenosyl-Methionin

Der erste β -Strang endet typischerweise in einem GxGxG-Motiv, welches charakteristisch für Nukleotidbindungsstellen ist. Ein azider Rest am Ende von $\beta 2$ stellt eine weitere streng konservierte Position dar, von wo aus Wasserstoffbrücken zu beiden Hydroxylgruppen der SAM-Ribose ausgebildet werden. Die beschriebene Methyltransferasenklasse enthält trotz der beobachteten strukturellen Konservierung viele Mitglieder mit unterschiedlichsten strukturellen Besonderheiten (Martin und McMillan, 2002). Methyltransferasen dieser Klasse treten meist als Monomere auf, man findet aber auch Homodimere und Tetramere (Huang et al., 2000). Viele Transferasen tragen in das konservierte Grundgerüst insertierte Hilfsdomänen, die wahrscheinlich für die Substraterkennung zuständig sind. Für die Methyltransferasen der Klassen 2-5 gibt es nur sehr wenige Beispiele, die von Schubert et al. zusammengefasst wurden (Schubert et al., 2003).

Durch bioinformatische Techniken wurde im Jahr 2001 die radikalische SAM-Proteinfamilie mit über 600 Mitgliedern entdeckt (Sofia et al., 2001). Diese Proteine nutzen einen Eisen-Schwefel-Cluster, um durch reduktive Spaltung des *S*-Adenosyl-Methionins eine radikalische Spezies zu generieren. An der Ausbildung des Eisen-Schwefel-Clusters sind die Cysteine eines CxxxCxxC-Motivs beteiligt, dass über alle Mitglieder dieser Familie hochkonserviert ist. Die zur radikalischen SAM-Familie gehörenden Proteine sind an ungewöhnlichen Methylierungen, Isomerisierungen, Schwefel-Einlagerungen, anaerobischen Oxidationen und der Bildung von Protein-Radikalen beteiligt. Ungewöhnliche Methylierungen werden durch eine Untergruppe der Proteinfamilie katalysiert (Sofia et al., 2001). Mitglieder dieser Untergruppe katalysieren Methylierungsreaktionen während der Biosynthese der Antibiotika Fortimicin KL1, Bialaphos und Fosfomycin (Kuzuyama et al., 1995). Ein als CloN6 bezeichnetes ähnliches Protein katalysiert die Methylierung des nicht nukleophilen C-Atoms der Pyrrol-Untereinheit des Antibiotikums Clorobiocin (Westrich et al., 2003). Es gibt Hinweise, dass diese Enzyme intermediär gebildetes Methylcobalamin als Methylgruppenüberträger nutzen (Kamigiri et al., 1992; Kuzuyama et al., 1992). Bisher wurden keine Methylcobalamin-abhängigen Methyltransferasen, die an der Sekundärmetabolitsynthese beteiligt sind, gereinigt und *in vitro* charakterisiert. Jedoch ist die Methioninsynthese ein Beispiel für eine gut charakterisierte Methylcobalamin-abhängige Methyltransfer-Reaktion (Matthews, 2001).

Die Methyltransferasen GlmT, DptI und LptI der aziden Lipopeptide zeigen keine Sequenzähnlichkeiten zu Mitgliedern der radikalischen SAM-Proteinfamilie, und ihnen fehlt das oben erwähnte konservierte CxxxCxxX-Motiv. Stattdessen deuten Sequenzanalysen dieser Methyltransferasen auf eine putative SAM-Bindungsstelle hin und zeigen Ähnlichkeiten zur Ubiquinon-Methyltransferase (UbiE) und anderen SAM-abhängigen Methyltransferasen (Milne et al., 2006). Aus diesem Grund wurde zu Beginn der hier vorgestellten Untersuchungen die Strategie eines radikalischen Methyltransfers zur Methylierung des chemisch unaktivierten C_β-Atoms des Glutamats ausgeschlossen.

5.3.2 Die Methylierung der aziden Lipopeptide geschieht vor dem Aufbau des Peptidrückgrats

Um den Biosyntheseweg des 3-MeGlu-Restes von CDA, Daptomycin, und A54145 aufzuklären, wurden die rekombinanten mutmaßlichen SAM-abhängigen Methyltransferasen GlmT aus *Streptomyces coelicolor*, DptI aus *Streptomyces roseosporus* und LptI aus *Streptomyces fradiae* überexprimiert, gereinigt und mit dem Methylgruppenüberträger SAM und verschiedenen Substraten inkubiert. Zunächst wurde der Zeitpunkt der Modifikation bestimmt: Die Methyltransferasen sind nicht in der Lage, an das rekombinante PCP des Moduls 10 der CDAIII-Synthetase gebundenes Glutamat oder ein synthetisches CDA-Analogon zu methylieren. Dies deutet auf eine Methylierung des Glutamats vor der Aktivierung durch die A-Domäne hin. In einer anderen Studie gewonnene *in vivo*-Resultate haben gezeigt, dass in einer *glmT*-Deletionsmutante von *Streptomyces coelicolor* ($\Delta glmT$) die Produktion von 3-MeGlu enthaltendem CDA durch Fütterung von (2*S*,3*R*)-3-MeGlu wiederhergestellt werden kann (Milne et al., 2006). Dies zeigt, dass die A-Domäne des Moduls 10 der CDAPSIII tatsächlich in der Lage ist, neben Glu auch (2*S*,3*R*)-3-MeGlu zu aktivieren und in das CDA-Rückgrat einzubauen. Diese Resultate stimmen auch mit der Beobachtung überein, dass sich die Aminosäure-Spezifitäts-vermittelnden Codes (Stachelhaus et al., 1999) der zum 3-MeGlu korrespondierenden A-Domänen der CDA-, Daptomycin- und A54145-NRPSs von anderen Glu-aktivierenden A-Domänen unterscheiden (Hojati et al., 2002). All diese Ergebnisse zeigen, dass die Methylierung von Glutamat vor dem Aufbau des Peptidrückgrats durch die NRPS stattfinden muss.

Eine ähnliche Strategie findet sich auch bei der Biosynthese des 3-Methylaspartat-Restes (MeAsp) des aziden Lipopeptids Friulimicin, das von *Actinoplanes friuliensis* produziert wird. Hier konnte ein aktiver Glutamat-Mutase-Komplex gereinigt und charakterisiert werden, welcher sich aus den Enzymuntereinheiten GlmA und GlmB zusammensetzt und Koenzym B₁₂-abhängig ist (Heinzelmann et al., 2003). Die Glutamat-Mutase setzt L-Glu in Lösung zu (2*S*,3*R*)-3-MeAsp um (Abb. 5.9).

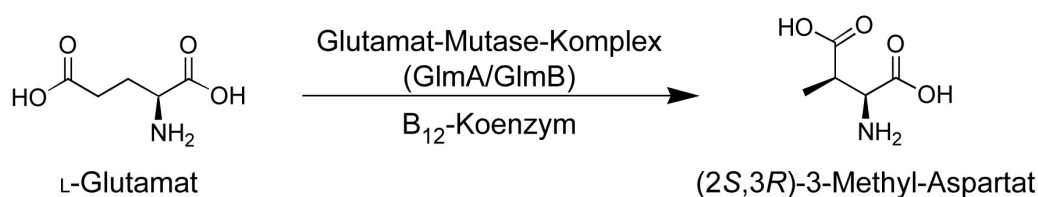


Abb. 5.9: Synthese des (2*S*,3*R*)-3-Methyl-Aspartats durch einen Vitamin B₁₂-abhängigen Glutamat-Mutase-Komplex während der Biosynthese des aziden Lipopeptids Friulimicin durch *Actinoplanes friuliensis*.

Dieses wird anschließend von der Peptidsynthetase aktiviert und in das Friulimicin eingebaut. Auch die C_β -Hydroxylierung des Asparagins des CDA findet vor der Aktivierung durch die korrespondierende A-Domäne statt (Strieker et al., 2007) (siehe Anhang Abschnitt 7.2).

5.3.3 GlmT, DptI und LptI sind SAM-abhängige α -Ketoglutarat-Methyltransferasen

GlmT, DptI und LptI wurden aufgrund von Untersuchungen an Deletionsmutanten und aufgrund von Sequenzvergleichen zunächst für SAM-abhängige Glutamat-Methyltransferasen gehalten, die die C_β -Methylierung von Glutamat katalysieren (Hojati et al., 2002; Nguyen et al., 2006) (Abschnitt 1.4.2). Im Verlauf dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Enzyme nicht die Methylierung von Glu, sondern die Methylierung der korrespondierenden α -Ketosäure α -Ketoglutarat zu 3-Methyl-2-Oxoglutarat katalysieren (Abschnitt 4.2.4). Diese Ergebnisse bestätigen Schlüsse, die aus einer Analyse des metabolischen Flusses der CDA-Biosynthese gezogen wurden (Kim et al., 2004): Hier wurde bereits vorgeschlagen, dass GlmT α KG methyliert, das dann zu 3-MeGlu transaminiert wird. Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Resultate stimmen auch gut mit Ergebnissen überein, die durch frühere *in vivo*-Untersuchungen gewonnen wurden (Milne et al., 2006): In diesen Studien wurde gezeigt, dass eine Fütterung von synthetischem 3-Methyl-2-Oxoglutarat, dem Methylierungsprodukt von α KG, eine Δ *glmT*-Mutante von *Streptomyces coelicolor* in die Lage zurückversetzt, 3-MeGlu enthaltendes CDA zu produzieren.

In Abschnitt 4.2.5 wurde gezeigt, dass GlmT, DptI und LptI eine hohe Substratspezifität aufweisen. Ähnliches konnte vor kurzem für eine *N*-Methylierungsdomäne der Enniatin-Synthetase aus *Fusarium scirpi* gezeigt werden: Die rekombinante M-Domäne wurde durch Inkubation mit löslichen Substratanaloga biochemisch charakterisiert. Diese Untersuchungen zeigten eine ausgesprochen hohe Stereoselektivität: Nur mit dem natürlichen Substrat L-Val konnte eine Methylierung beobachtet werden, nicht aber mit dem unnatürlichen Substrat D-Val (Hornbogen et al., 2007).

5.3.3.1 Die C-Methylierung verläuft über resonanzstabilisierte Carbanionen

Die Methylierung von α -Ketoglutarat anstelle von Glutamat ist chemisch gesehen sinnvoll: Da die meisten SAM-abhängigen Methylierungen nach einem S_N2 -Mechanismus als ein nukleophiler Angriff eines Substrats auf die aktivierte Methylgruppe des Methylgruppendonors SAM ablaufen (Mascaro et al., 1977; Schubert et al., 2003), würde eine

direkte SAM-abhängige C_{β} -Methylierung von Glu die Bildung eines instabilen β -Carbanions erfordern. Die intermediäre Ausbildung eines resonanzstabilisierten nukleophilen Enolats von α -Ketoglutarat ist plausibler (Abb. 5.10). Eine mechanistisch ähnliche SAM-abhängige Methylierung der α -Ketosäure Indolpyruvat findet während der Biosynthese des Antibiotikums Indolmycin statt (King et al., 1977) (Abb. 5.10).

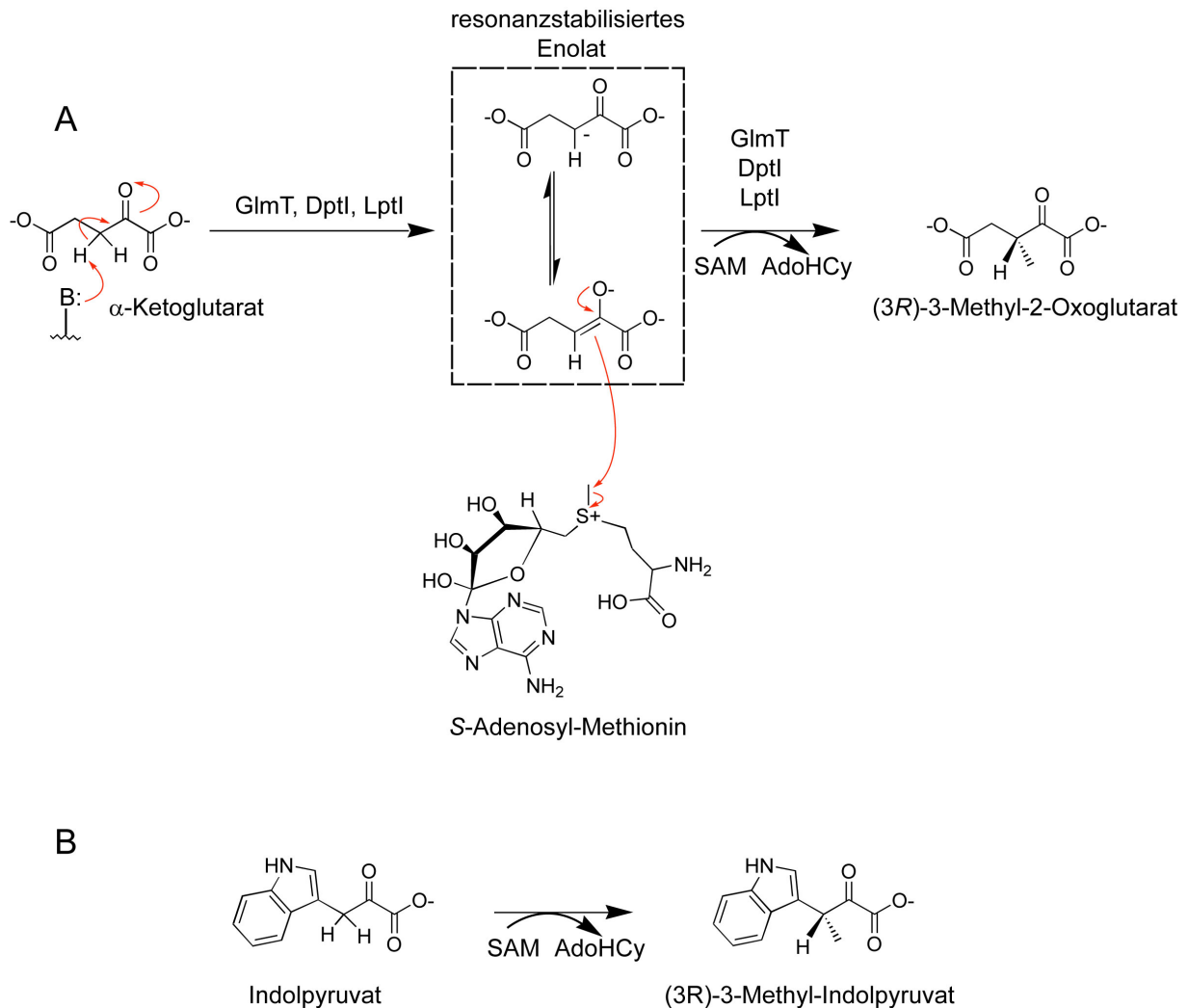


Abb. 5.10: Postulierter Mechanismus der C_{β} -Methylierung von α -Ketoglutarat durch die SAM-abhängigen Methyltransferasen GlmT, DptI und LptI.

A: α -Ketoglutarat wird durch die Methyltransferase an der β -Position deprotoniert, wodurch ein resonanzstabilisiertes Enolat-Ion entsteht. Eine vergleichbare Resonanzstabilisierung wäre bei einer Deprotonierung der β -Position von Glutamat nicht möglich, in diesem Fall würde ein hochenergetisches instabiles Carbanion entstehen. Das resonanzstabilisierte Enolat ist in der Lage, als C-Nukleophil einen nukleophilen Angriff auf die aktivierte Methylgruppe des Kosubstrats SAM auszuführen. Als Produkte dieser Reaktion werden (3R)-3-Methyl-2-Oxoglutarat und AdoHcy freigesetzt.

B: SAM-abhängige Methylierung von Indolpyruvat während der Biosynthese des Antibiotikums Indolmycin. Auch in diesem Fall findet die direkte Methylierung einer α -Ketosäure durch eine SAM-abhängige Methyltransferase statt.

Die intermediäre Ausbildung von resonanzstabilisierten Carbanionen wird auch für die Mechanismen anderer C-Methylierungen postuliert, die während der Synthese einiger Polyketide oder PK/NRP-Hybride stattfinden. In diesen Fällen scheint die Verwendung von in die Synthetasen eingebetteten C-Methyltransferasen eine gängige Strategie zu sein, ähnlich wie bei den N-Methyltransferasen der NRPSs (Abschnitt 1.2.2.2). Ein Beispiel ist die Synthese des von *Yersinia pestis* synthetisierten Siderophors Yersiniabactin (Miller et al., 2002). Die Untereinheit HMWP1 (350 kDa) der Yersiniabactin-Synthetase besteht aus einem PKS-Modul, das fünf Domänen enthält, und einem NRPS-Modul, das 4 Domänen enthält. Jedes Modul besitzt eine C-Methyltransferasedomäne. Während die erste Transferase zwei Methylgruppen in den *tert*-Butyl-Linker zwischen dem Thiazolidin- und dem Methylthiazolin-Ring einführt (Miller et al., 2002), katalysiert die zweite Methyltransferase die C $_{\alpha}$ -Methylierung des Thiazolinrings (Miller et al., 2001). Das Substrat der ersten beiden Methylierungen ist ein β -Ketoacyl-S-ACP, das der zweiten ein Thiazoliny-S-PCP (Abb. 5.11). Beide Spezies können ähnlich wie im Fall des α -Ketoglutarats durch Deprotonierung niedrig-energetische stabilisierte Carbanionen ausbilden, die die elektrophile Methylgruppe des Methylgruppendonors SAM nukleophil angreifen können. Ähnliche C-Methyltransferasedomänen wurden auch in den Biosynthesegenclustern des Antitumor-Wirkstoffs Bleomycin aus *Streptomyces verticillus* (Du et al., 2000) und des Cholesterin-Spiegel-Senkers Lovastatin aus *Aspergillus terreus* (Hendrickson et al., 1999; Kennedy et al., 1999) entdeckt.

Für die Methylierung von α KG wurde für GlmT in der vorliegenden Arbeit ein K_M von 62.6 μ M, ein k_{cat} von 0.11 min $^{-1}$ und ein k_{cat}/K_M von 1.78 min $^{-1}$ mM $^{-1}$ bestimmt. Für kinetische Parameter von C-Methylierungen gibt es in der Literatur nur wenige Angaben. Zum Beispiel liegen die kinetischen Parameter der NovO- und CouO-katalysierten C-Methylierungen des Aminocoumarin-Gerüsts während der Biosynthese der Antibiotika Novobiocin und Coumermycin in der gleichen Größenordnung wie die in dieser Arbeit bestimmten Werte (Pacholec et al., 2005). Die NovO-katalysierte Methylierung weist für das natürliche Substrat (Abb. 5.12) z.B. einen K_M von 26.5 μ M und einen k_{cat} von 0.5 min $^{-1}$ auf. Auch die genannten Methylierungen der Aminocoumarin-Antibiotika erfolgen über die Ausbildung von stabilisierten Carbanionen, die durch die Nachbarschaft eines phenolischen Sauerstoffatoms gebildet werden können (Abb. 5.12). Erst nach den C-Methylierungen erfolgen O-Glykosylierungen dieses phenolischen Sauerstoffs. Eine umgekehrte Reihenfolge würde die Ausbildung der stabilisierten Carbanionen verhindern.

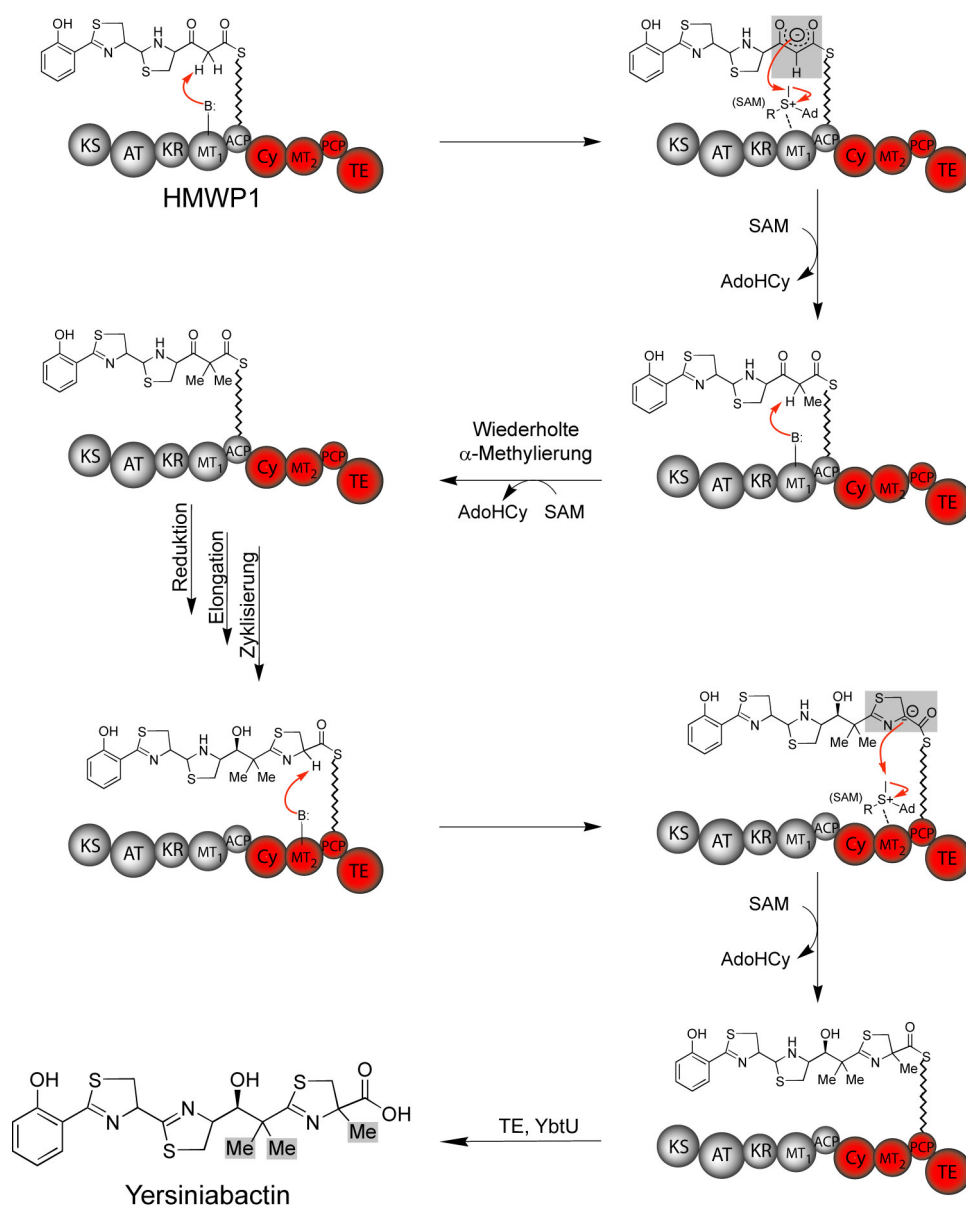


Abb. 5.11: C-Methylierungen während der Biosynthese von Yersiniabactin in *Yersinia pestis*.

Die Yersiniabactin-Synthetase setzt sich aus den vier Proteinen YbtE, HMWP2, HMWP1 und YbtU zusammen (Miller et al., 2002). YbtE, HMWP2 und die ersten beiden Domänen von HMWP1 synthetisieren den zu Beginn der obigen Reaktionssequenz gezeigten Vorläufer und immobilisieren ihn auf dem ACP des PKS-Moduls (grau) von HMWP1. Die Methyltransferase MT₁ dieses Moduls abstrahiert am C_α-Atom ein Proton von diesem β-Keto-Acyl-ACP, wodurch ein resonanzstabilisiertes Carbanion (grau unterlegt) entsteht, das einen nukleophilen Angriff auf die aktivierte Methylgruppe des SAM ausführt. Nach dieser Methylierung führt die MT₁-Domäne nach dem gleichem Mechanismus eine zweite C_α-Methylierung des β-Keto-Acyl-ACPs durch. Nach Reduktion durch die Ketoreduktase-Domäne (KR) erfolgt über eine Cy-Domäne die Kondensation mit einem PCP-gebundenen Cystein und die Heterozyklisierung zum Thiazolinring. Der nun PCP-gebundene Yersiniabactin-Vorläufer wird durch die MT₂-Domäne des NRPS-Moduls deprotoniert, wodurch wiederum ein resonanzstabilisiertes Carbanion (grau unterlegt) entsteht, was nach nukleophilem Angriff auf das SAM-Kosubstrat zur C-Methylierung des Thiazolinrings führt. Durch Katalyse der TE-Domäne und YbtU, das den Thiazolidinring zum Thiazolring oxidiert, wird die Synthese des Yersiniabactins abgeschlossen. Die durch die C-Methyltransferasen eingeführten Methylgruppen sind im Endprodukt hervorgehoben.

KS, Ketosynthase; AT, Acyltransferase; KR, Ketoreduktase; ACP, Acyl-Carrier-Protein.

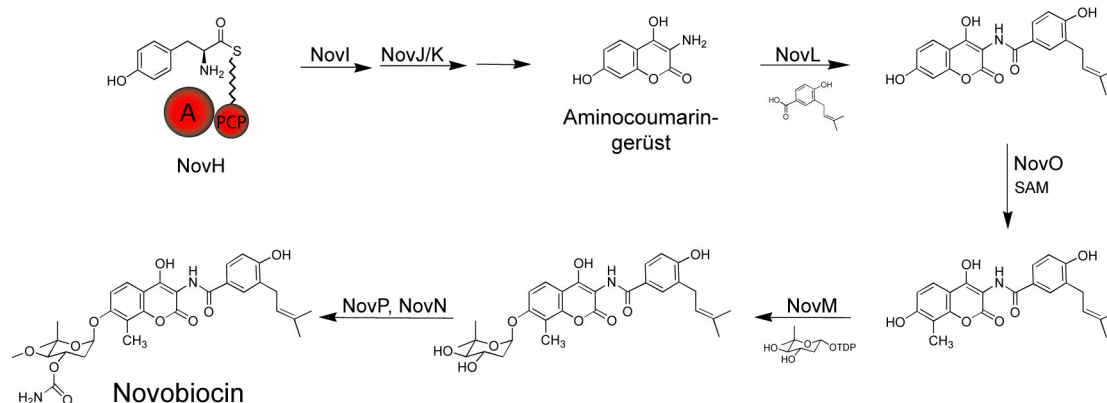


Abb. 5.12: C-Methylierung während der Biosynthese des Aminocoumarin-Antibiotikums Novobiocin.

Die Novobiocin-Synthese beginnt mit dem Aufbau des AminocoumarinGrundgerüsts. Ein an die aus einem A-PCP-Dimodul bestehende Peptidsynthetase NovH gebundenes Tyrosin wird durch die Häm-abhängige Oxygenase NovI C_β -hydroxyliert. Eine weitere Oxidation der entstandenen Hydroxylgruppe durch ein Heterotetramer aus den NADP-abhängigen Enzymen NovJ und NovK führt zur Ausbildung eines PCP-gebundenen β -Keto-Tyrosins. Eine weitere Oxidation und eine Laktonisierung führen zum freien Aminocoumarin-Grundgerüst. Dies wird durch die alleinstehende Ligase NovL mit 3-Prenyl-4-Hydroxybenzoat ligiert. Erst danach findet die NovO-katalysierte SAM-abhängige Methylierung in Nachbarschaft zum phenolischen Sauerstoff statt. Im Anschluss an die Methylierung erfolgt eine NovM-katalysierte Glykosylierung. Die Novobiocinsynthese wird durch eine NovN-katalysierte Carbaomylierung und eine NovP-katalysierte Methylierung abgeschlossen.

Die zuvor beschriebenen Methylierungsbeispiele finden entweder als Modifikationen nach dem Aufbau des Molekülgrundgerüsts (Novobiocin, Coumermycin) oder an einem PCP- oder ACP-gebundenen Baustein statt (Yersiniabactin). Interessanterweise ist die in dieser Arbeit beschriebene Methylierung das erste Beispiel einer C-Methylierung eines NRPS-Produktes, die vor der Aktivierung des modifizierten Bausteins durch die Synthetase geschieht.

5.3.4 Transaminierung von 3-Methyl-2-Oxoglutarat zu 3-Methyl-Glutamat

In Abschnitt 4.2.6 wurde gezeigt, dass die zum Primärstoffwechsel gehörende verzweigtkettige Aminosäure-Transaminase IlvE (SCO5523) aus *Streptomyces coelicolor* in der Lage ist, *in vitro* in Anwesenheit von L-Val als Aminogruppendonor die Transaminierung von 3-Methyl-2-Oxoglutarat zu 3-MeGlu zu katalysieren. In den folgenden Abschnitten soll diese Beobachtung in Bezug auf mechanistische und strukturelle Aspekte diskutiert werden.

5.3.4.1 Katalytischer Mechanismus von Aminotransferasen

Allgemein sind Aminotransferasen Pyridoxal-5'-Phosphat (PLP)-abhängige Enzyme, die reversible Transaminierungsreaktionen katalysieren, die aus zwei identischen Halbreaktionen bestehen. Die α -Aminogruppe der Aminosäure 1 wird auf PLP übertragen, wodurch ein Pyridoxamin-5'-Phosphat (PMP) und die zur Aminosäure 1 korrespondierende α -Ketosäure 1 entstehen. In der zweiten Halbreaktion übernimmt eine zweite α -Ketosäure die Aminogruppe vom PMP, wodurch die Aminosäure 2 gebildet und der PLP-Kofaktor regeneriert wird (Abb. 5.13).

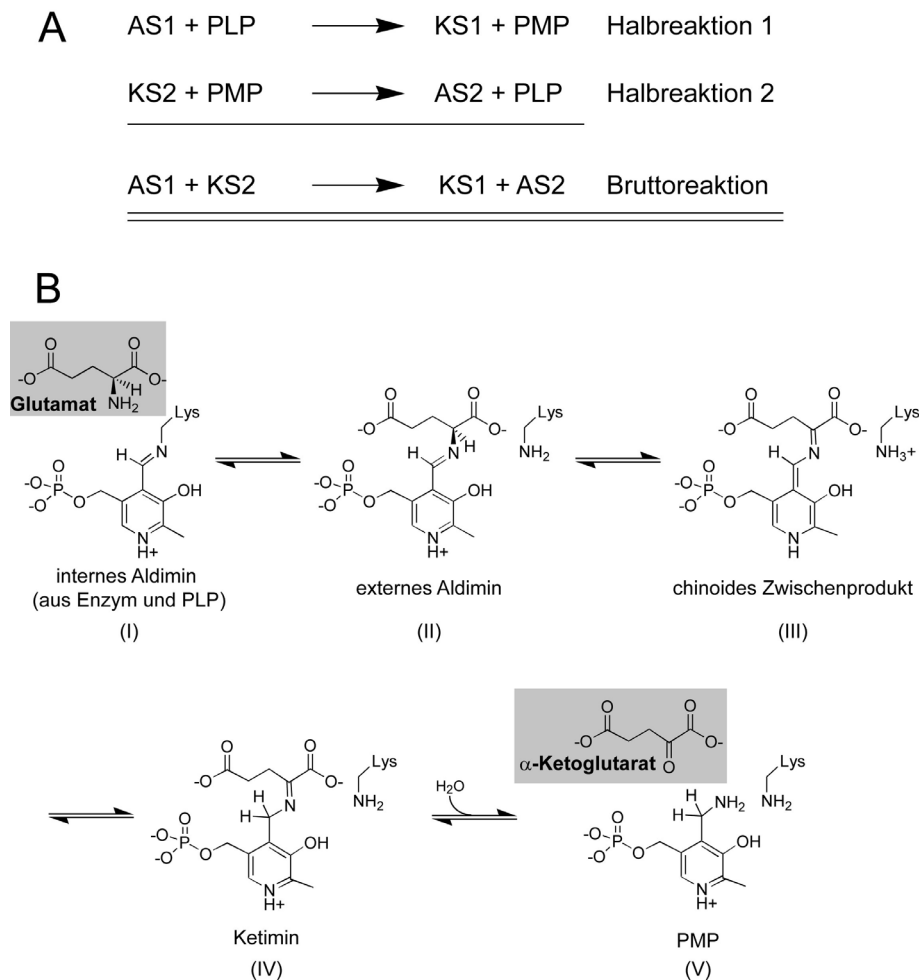


Abb. 5.13: Katalytischer Mechanismus der Aminotransferasen.

A: Schematische Darstellung der beiden Halbreaktionen der Transaminierungsreaktion und Darstellung der Bruttoreaktion. AS, Aminosäure; KS, α -Ketosäure.

B: Detaillierte mechanistische Darstellung der ersten Halbreaktion einer Transaminierung am Beispiel von Glutamat. (I) Bindung von Glutamat an die Aminotransferase, in der der PLP-Kofaktor an einen konservierten Lys-Rest des Enzyms als internes Aldimin kovalent gebunden vorliegt. (II) Umwandlung zum externen Aldimin aus Aminosäure und PLP. Die Aminogruppe des Lys wird freigesetzt, der Kofaktor bleibt durch nichtkovalente Kräfte fest an das Enzym gebunden. (III) Deprotonierung des C_{α} -Atoms des Glutamats durch den konservierten Lys-Rest, Ausbildung eines chinoiden Zwischenprodukts. (IV) Reprotonierung des chinoiden Zwischenprodukts am Kofaktor, Bildung eines Ketimins. (V) Hydrolyse des Ketimins, Bildung von α -Ketoglutarat und PMP. In der zweiten Halbreaktion verlässt α -Ketoglutarat das Enzym und eine andere α -Ketosäure tritt in das aktive Zentrum ein. Nun laufen die gezeigten Reaktionen in die Gegenrichtung ab, wodurch das interne Aldimin zurückgebildet und die zur eingetretenen α -Ketosäure komplementäre Aminosäure freigesetzt wird.

Dieser Mechanismus wird als Pingpong-Mechanismus bezeichnet. Normalerweise weisen Aminotransferasen des Primärstoffwechsels ein spezielles Aminosäuresubstrat / Ketosäuresubstrat-Paar für die eine Halbreaktion auf, während sie in der anderen Halbreaktion häufig Glutamat / α -Ketoglutarat als Substrat-Paar verwenden (Goto et al., 2003).

5.3.4.2 Die verzweigtkettige Aminosäure-Transaminase IlvE

Die verzweigtkettige Aminosäure-Transaminase IlvE ist eine von 77 bekannten oder putativen Aminotransferasen, die durch das Genom von *Streptomyces coelicolor* kodiert werden. IlvE ist möglicherweise nur eines von mehreren Enzymen, die eine Aminogruppe von verschiedenen Aminogruppen-Donoren auf 3-Methyl-2-Oxoglutarat übertragen können. In den Biosynthesegenclustern von CDA, Daptomycin und A54145 sind keine uncharakterisierten Aminotransferasen vorhanden, die diese Transaminierung durchführen könnten.

Die verzweigtkettige Aminosäure-Transaminase IlvE katalysiert in Bakterien im Primärmetabolismus den letzten Schritt der Biosynthese bzw. den ersten Schritt des Abbaus der verzweigtkettigen Aminosäuren Val, Ile und Leu (Kagamiyama und Hayashi, 2000). Diese Aminosäuren werden aus ihren korrespondierenden α -Ketosäuren durch einen Aminogruppentransfer vom Glutamat gebildet. Beim Abbau der Aminosäuren wird die Aminogruppe auf α -Ketoglutarat übertragen, wodurch wieder die zu Val, Ile und Leu korrespondierenden α -Ketosäuren und Glutamat entstehen. IlvE ist also eine Transaminase mit Selektivität für die unpolaren Aminosäuren Val, Ile und Leu und für die saure Aminosäure Glutamat.

Im Jahr 2003 ist die Kristallstruktur von IlvE aus *E. coli* in Komplex mit Glutamat und Glutarat gelöst worden (Goto et al., 2003) (Abb. 5.14). Bei dem Enzym handelt es sich um ein Homohexamer, das aus einem Trimer von Dimeren zusammengesetzt ist. Die einzelnen Untereinheiten teilen sich in eine kleine (vom N-Terminus bis zu Tyr-124 und von Leu-303 bis zu Gln-308) und eine große Domäne (von Gln-137 bis zu Trp-302) auf, die durch einen Interdomänen-Loop (Pro-125 bis zu Glu-136) verbunden sind. Das aktive Zentrum setzt sich aus der Aushöhlung zwischen der großen und der kleinen Domäne und zwei Loops der kleinen Domäne einer anderen Untereinheit zusammen. Der Kofaktor und das Substrat binden in dieser Aushöhlung. Der Interdomänen-Loop, der in Kristallstrukturen ohne Substrat ungeordnet vorliegt (Okada et al., 2001), hat eine definierte Struktur und schließt das aktive Zentrum.

Ein Vergleich der Kristallstrukturanalysen von IlvE im Komplex mit verschiedenen Substraten zeigt, dass IlvE die hydrophoben Aminosäuren und Glutamat in derselben Bindungstasche bindet, obwohl sie sich in Eigenschaften und Gestalt unterscheiden. Die Bindungstasche für die Seitenketten der Aminosäuren wird durch Phe-36, Arg-97, Trp-126, Tyr-129, Tyr-164, Tyr-31 und Val-109 geformt (Abb. 5.14). Die sterisch anspruchsvollen Seitenketten der hydrophoben Aminosäuren interagieren hauptsächlich mit den aromatischen Ringen der umgebenden Reste.

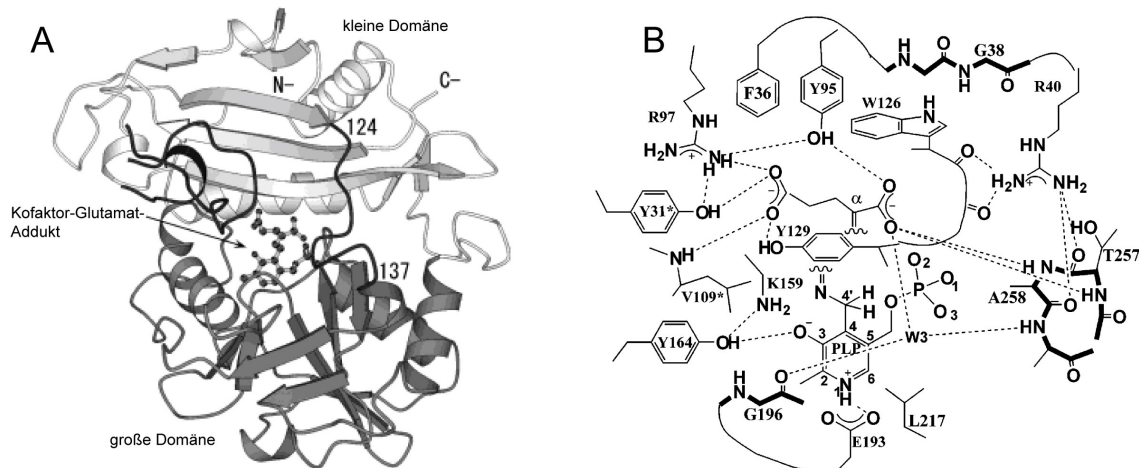


Abb. 5.14: Kristallstruktur der verzweigtkettigen Aminosäure-Transaminase IlvE aus *E. coli* (aus Goto et al., 2003).

A: Ansicht der Struktur einer Untereinheit in Komplex mit Glutamat. Die dunklen und hellen Bereiche repräsentieren jeweils die große und die kleine Domäne. Die Interdomänen-Schleifen und Schleifen von der anderen Untereinheit der Dimer-Einheit sind in schwarz gezeichnet. Der Kofaktor-Glutamat-Komplex ist durch das Ball-und-Stäbchen-Modell dargestellt.

B: Schematische Darstellung der Wasserstoffbrücken- und Salzbrücken-Wechselwirkungen im aktiven Zentrum des IlvE-Glutamat-Komplexes. Die $C\alpha=N$ -Doppelbindung des Kofaktor-Glutamat-Addukts ist im Schema aus Gründen der klareren Darstellung unterbrochen worden. Mutmaßliche Wechselwirkungen, bei denen die beiden Partner weniger als 3.3 Å voneinander entfernt sind, sind durch gestrichelte Linien dargestellt. Zwei Wassermoleküle und die Wasserstoffbrückenbindungen, die mit der Phosphatgruppe des PLP ausgebildet werden, sind zur klareren Darstellung weggelassen.

Die Oberfläche der Bindungstasche ist fast durchgehend hydrophob, es existieren nur vier polare Positionen, die für die Bindung des γ -Carboxylats des Glutamats verantwortlich sind: die Guanidinogruppe von Arg-97, die Hydroxylgruppe von Tyr-31, die Hydroxylgruppe von Tyr-129 aus dem Interdomänenloop und die Val-109-NH-Gruppe des Peptidrückgrats. Die saure Seitenkette des Glutamats geht über ihre terminale Carboxylgruppe ein Netzwerk aus drei Wasserstoffbrücken und einer Salzbrücke ein. Zusammenfassend bindet IlvE also in der identischen Bindungstasche, die überwiegend hydrophob ist, aber lokal hydrophile Stellen aufweist, die hydrophoben und sauren Seitenketten der Aminosäure- bzw. α -Ketosäuresubstrate.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich eine Erklärung ableiten, warum IlvE außer Glutamat und α -Ketoglutarat zusätzlich 3-MeGlu und 3-Methyl-2-Oxoglutarat als Substrate akzeptiert: Die

in den zuletzt genannten Substraten zusätzliche Methylgruppe an der β -Position ist auch in den β -verzweigten Aminosäuren Val und Ile vorhanden, die in derselben Bindungstasche gebunden werden. Aus diesem Grund muss in der Bindungstasche von IlvE genug Raum für die β -Methylgruppe zur Verfügung stehen, wodurch sie nicht zu einer Verhinderung der Bindung von 3-MeGlu oder 3-Methyl-2-Oxoglutarat an IlvE führen kann.

5.3.4.3 Kinetische Charakterisierung der IlvE-katalysierten Transaminierung von 3-Methyl-2-Oxoglutarat

Für die IlvE-katalysierte Transaminierung von 3-Methyl-2-Oxoglutarat wurden in dieser Arbeit die kinetischen Parameter der Reaktion bei einer Konzentration des Aminogruppendonors Val von 5 mM bestimmt. Es ergab sich ein K_M von 0.196 mM, ein k_{cat} von 12.1 s^{-1} und ein k_{cat}/K_M von $3716 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$. Diese Werte liegen in der gleichen Größenordnung wie die Parameter, die für IlvE aus *E. coli* für α -Ketoglutarat in Anwesenheit von Val bestimmt wurden (K_M : 1.7 mM; k_{cat} : 19 s^{-1} ; k_{cat}/K_M : $660 \text{ min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$) (Inoue et al., 1988).

In einer aktuellen Studie wurde das Potential von IlvE aus *E. coli*, Derivate von α -Ketoglutarat zu transaminieren, detailliert untersucht (Xian et al., 2007). Interessanterweise ist das Enzym in der Lage, eine Reihe von an der Position 3 und 4 alkylierten Derivaten zu transaminieren. Die an Position 3 akzeptierten Substituenten reichen dabei von Methyl- über Ethyl- und Propylgruppen bis zum sterisch anspruchsvollen Phenylrest, und auch an Position 4 werden unterschiedliche Substituenten akzeptiert. In der beschriebenen Studie wurde für die Transaminierung von 3-Methyl-2-Oxoglutarat ein K_M von 0.22 mM gemessen. Dieser Wert kommt dem für IlvE aus *Streptomyces coelicolor* gemessenen von 0.196 mM sehr nahe.

5.3.5 Stereospezifität der Methylierungs- und Transaminierungsreaktion

In Abschnitt 4.2.6.3 wurde durch einen gekoppelten Methylierungs-Transaminierungsassay mittels GlmT und IlvE aus *Streptomyces coelicolor* und nachfolgende HPLC-Analyse der dabsylierten Produkte gezeigt, dass die Kombination dieser beiden enzymatischen Reaktionen ausgehend vom Substrat α -KG ausschließlich zur Bildung von enantiomerenreinem (2*S*,3*R*)-3-MeGlu führt. GlmT katalysiert also eine stereospezifische Methylierung von α -KG

zu (3*R*)-3-Methyl-2-Oxoglutarat, das dann von IlvE, welches ausschließlich die Bildung von (2*S*)-Aminosäuren katalysiert, stereospezifisch zu (2*S*,3*R*)-3-MeGlu transaminiert wird.

Die (2*S*,3*R*)-Konfiguration des enzymatisch hergestellten 3-MeGlu stimmt mit der beobachteten Konfiguration des 3-MeGlu-Restes von CDA und Daptomycin überein (Debono et al., 1987; Kagan und Meister, 1966; Milne et al., 2006). Die Ähnlichkeit der Proteinsequenzen der Methyltransferasen GlmT, DptI und LptI und der A-Domänen für die Glu/3-MeGlu-Aktivierung der CDA-, Daptomycin- und A54145-Synthetasen legt die Vermutung nahe, dass der 3-MeGlu-Rest im A54145 dieselbe absolute Konfiguration aufweist. Vor kurzem publizierte *in vivo*-Resultate haben gezeigt, dass die Glu/3-MeGlu-aktivierende A-Domäne des Moduls 10 der CDAPSIII eine hohe Stereospezifität aufweist: In einer Δ *glmT*-Mutante von *Streptomyces coelicolor* konnte die Produktion von 3-MeGlu enthaltendem CDA nur durch Zufütterung von synthetischem (2*S*,3*R*)-3-MeGlu wiederhergestellt werden, nicht aber durch Zufütterung des (2*S*,3*S*)-Diastereomers (Milne et al., 2006). Die in der vorliegenden Arbeit präsentierten Ergebnisse zeigen, dass die Konfiguration des 3-MeGlu-Restes der aziden Lipopeptide nicht nur durch die Stereoselektivität der Peptidsynthetasen, sondern auch durch die Stereospezifität des Biosynthesewegs des 3-MeGlu kontrolliert wird.

5.3.6 Weitere C-Funktionalisierungen

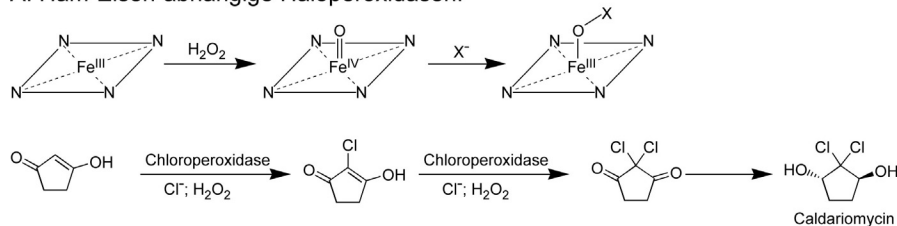
Im Verlauf der Diskussion wurden verschiedene Beispiele von C-Methylierungen vorgestellt. Weitere C-Funktionalisierungen, die die Diversität von Sekundärmetaboliten deutlich erhöhen, sind vor allem Halogenierungen und Hydroxylierungen, für die im Folgenden einige Beispiele genannt werden sollen. Für diese Funktionalisierungen gibt es unterschiedliche Strategien, die unter anderem von der Reaktivität des zu funktionalisierenden C-Atoms abhängen. Bei den Halogenierungen laufen Chlorierung, Bromierung und Iodierung nach sehr ähnlichen Mechanismen ab, die unter Oxidation des Halogenids stattfinden. Fluorierungen können aufgrund der hohen Elektronegativität des Fluoridions nicht nach analogen Mechanismen stattfinden, weshalb fluorierte Metabolite in der Natur sehr selten vorkommen (Vaillancourt et al., 2006). Für die Katalyse von Chlorierung, Bromierung und Iodierung sind in der Natur die folgenden vier Enzymklassen zuständig: die Häm-Eisen- und die Vanadium-abhängigen Haloperoxidasen, die Wasserstoffperoxid zur Oxidation des Halogenid-Ions verwenden, und die FADH₂- und die Nicht-Häm-Eisen- α -Ketoglutarat-abhängigen Halogenasen, die molekularen Sauerstoff zur Oxidation des Halogenids verwenden

(Vaillancourt et al., 2006). Die Häm- und Vanadium-abhängigen Haloperoxidasen sowie die FADH₂-O₂-abhängigen Halogenasen bilden während der Katalyse kovalent gebundene bzw. im letzteren Fall im aktiven Zentrum frei diffundierende Hypohalit-Intermediate (HOX) aus, die als „X⁺“-Äquivalente mit elektronenreichen Substraten reagieren können (Abb. 5.15). Beispiele hierfür findet man in der Biosynthese des Caldariomycins (Hager et al., 1966; Morris und Hager, 1966; Taurog und Howells, 1966), des Snyderols (Carter-Franklin und Butler, 2004) und des 7-Chloro-Tryptophans, das ein Intermediat der Rebeccamycin-Biosynthese ist (Yeh et al., 2005).

Die FADH₂-O₂-abhängigen Halogenasen weisen eine große Sequenzhomologie zu Flavoprotein-Monooxygenasen auf. Beide Enzymklassen besitzen eine zusätzliche NAD(P)H-abhängige Reduktasedomäne, die den Flavinkofaktor in die reduzierte Form überführt. Diese Domäne kann in beiden Klassen als separates Enzym oder an die Oxygenase fusioniert vorliegen (Vaillancourt et al., 2006). Ein Beispiel für eine durch solch eine Monooxygenase katalysierte Reaktion ist die *ortho*-Hydroxylierung von 4-Hydroxy-Benzoat, bei der der elektronenreiche Phenolring den Transfer eines „OH⁺“ vom FAD-OOH im aktiven Zentrum ermöglicht (Abb. 5.15) (Entsch et al., 1976; Entsch et al., 1980; Massey, 1994).

Die bisher beschriebenen Halogenierungen und Hydroxylierungen laufen an elektronenreichen Substraten ab. Für die Halogenierung und Hydroxylierung von aliphatischen C-Atomen, die sich nicht in der Nähe von aktivierenden Gruppen befinden, hat die Natur eine Strategie entwickelt, die über radikalische Intermediate verläuft. Diese Reaktionen werden von den Nicht-Häm-Eisen- α -Ketoglutarat-O₂-abhängigen Halogenasen und Hydroxylasen katalysiert (Hausinger, 2004; Vaillancourt et al., 2006). Im Verlauf von deren katalytischem Zyklus wird das Kosubstrat α -Ketoglutarat decarboxyliert, wobei ein Atom des molekularen Sauerstoffs in das Koprodukt Succinat eingebaut wird, während das andere eine hochreaktive Fe^{IV}=O-Spezies ausbildet, die ein H-Radikal vom zu methylierenden C-Atom abstrahiert. Dadurch entstehen eine Fe^{III}-OH-Spezies und ein C-Radikal in direkter Nachbarschaft zueinander (Abb. 5.16). In den Halogenasen ist am Fe^{III} zusätzlich ein Halogenid-Ion gebunden, das in den Hydroxylasen durch einen Aspartat-Rest des aktiven Zentrums ersetzt wird. Je nach Enzym rekombiniert das C-Radikal nun mit einem OH-Radikal zum hydroxylierten oder einem Halogen-Radikal zum halogenierten Produkt, wodurch der ursprüngliche Fe^{II}-Redoxzustand zurückgebildet wird. Beispiele für diese Reaktionen sind die SyrB2-katalysierte Chlorierung des Thr₇ im Syringomycin (Abb. 5.16, Abb. 1.1) (Vaillancourt et al., 2005) und die AsnO-katalysierte C _{β} -Hydroxylierung des Asn₉ im CDA (Abb. 5.16) (Strieker et al., 2007).

A: Häm-Eisen-abhängige Haloperoxidasen:



B: Vanadium-abhängige Haloperoxidasen:

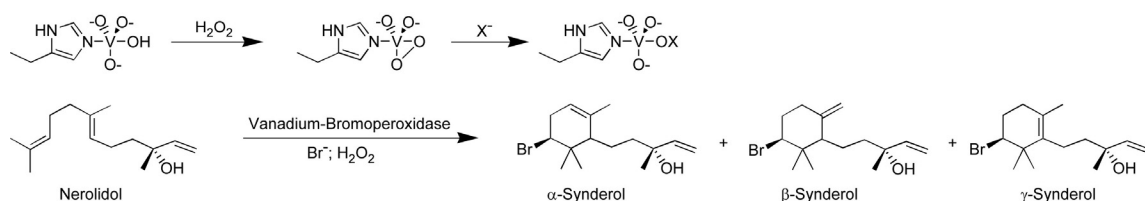
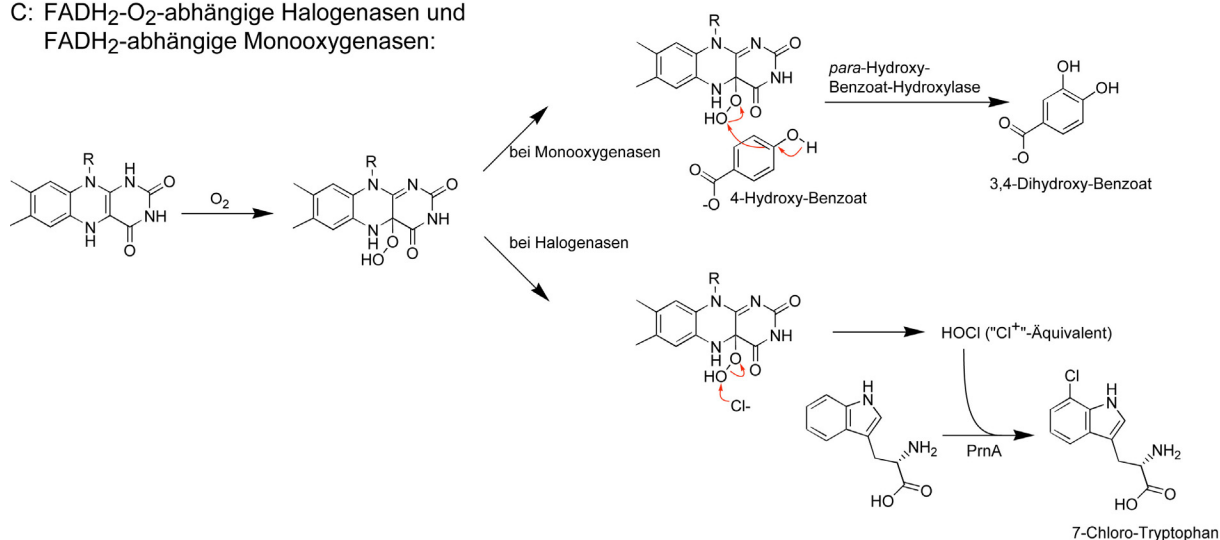
C: FADH₂-O₂-abhängige Halogenasen und FADH₂-abhängige Monooxygenasen:

Abb. 5.15: Reaktionsmechanismen von Häm- und Vanadium-abhängigen Haloperoxidasen und von FADH₂-abhängigen Halogenasen- und Monooxygenasen.

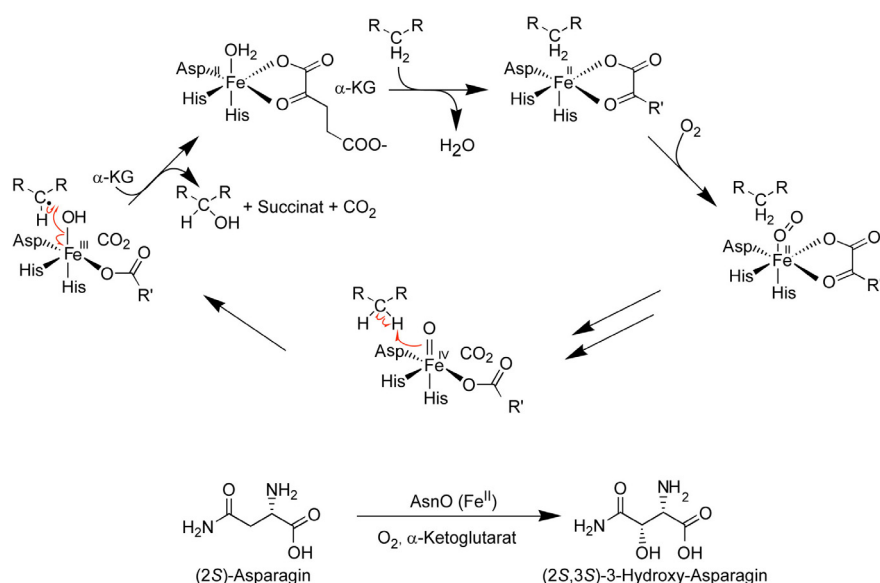
A: Reaktive Intermediate während der Halogenierung durch Häm-Eisen-abhängige Haloperoxidasen. Das Häm-Eisen-gebundene Hypohalit dient als „X⁺“-Äquivalent, das von elektronenreichen Substraten nukleophil angegriffen werden kann. Das Reaktionsbeispiel zeigt zwei Chlorierungen während der Biosynthese von Caldariomycin, die über stabilisierte Carbanionen ablaufen.

B: Reaktive Intermediate während der Halogenierung durch Vanadium-abhängige Haloperoxidasen. Ein Vanadat-gebundenes Hypohalit dient hier als „X⁺“-Äquivalent. Das Reaktionsbeispiel zeigt die Bromierung des Sesquiterpens Nerolidol, was zur Bildung von α , β und γ -Synderol führt.

C: Reaktionsintermediate im Mechanismus von FADH₂-O₂-abhängigen Halogenasen und FADH₂-abhängigen Monooxygenasen. Der Schlüsselschritt in beiden Mechanismen ist die Ausbildung eines FAD-OOH-Hydroperoxyflavinaddukts aus FADH₂ und Sauerstoff. Bei den Monooxygenasen wird dieses Addukt durch elektronenreiche Substrate nukleophil angegriffen, was hier am Beispiel der Hydroxylierung von 4-Hydroxy-Benzoat gezeigt ist. Bei den Halogenasen bildet sich durch nukleophilen Angriff eines Halogenids auf das Hydroperoxyflavinaddukt ein HOCl-Äquivalent oder ein FAD-OCl aus, das als „X⁺“-Äquivalent dient. Dieses wird von den Substraten nukleophil angegriffen, was hier am Beispiel der Chlorierung von Tryptophan durch die Tryptophan-7-Halogenase PrnA gezeigt ist.

Die Chlorierung des Thr im Verlauf der Syringomycin-Synthese findet statt, während die Aminosäure an den ppan-Kofaktor des PCP der NRPS-Synthetase SyrB1 gebunden ist. Die Hydroxylierung des Asparagins während der CDA-Synthese findet dagegen an der freien Aminosäure statt. Durch eine Kristallstrukturanalyse von AsnO als apo-Protein, in Komplex mit Fe^{2+} und als Produktkomplex konnte vor kurzem der Mechanismus der Hydroxylase aufgeklärt werden, was das Verständnis sowohl der Stereoselektivität als auch der Substratspezifität des Enzyms ermöglichte. Die Hydroxylierung geschieht in diesem Fall in Lösung und bildet (2*S*,3*S*)-3-hAsn als Substrat für die NRPS-Synthese (Strieker et al., 2007).

A: Nicht-Häm-Eisen- α -Ketoglutarat- O_2 -abhängige Hydroxylasen:



B: Nicht-Häm-Eisen- α -Ketoglutarat- O_2 -abhängige Halogenasen:

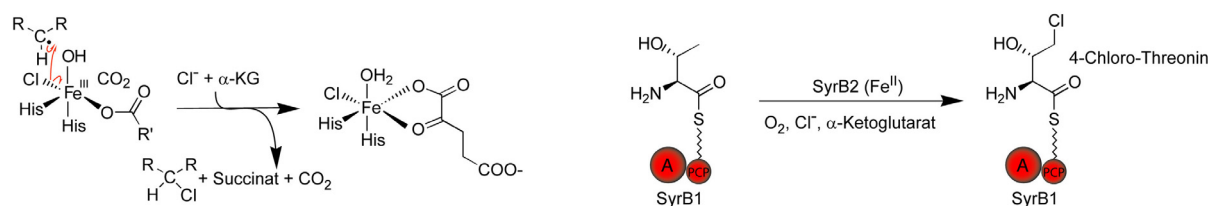


Abb. 5.16: Reaktionsmechanismen von Nicht-Häm-Eisen- α -Ketoglutarat- O_2 -abhängigen Hydroxylasen und Halogenasen.

A: Katalysezyklus von Nicht-Häm-Eisen- α -Ketoglutarat- O_2 -abhängigen Hydroxylasen. Als Beispiel ist die AsnO-katalysierte C_β -Hydroxylierung von Asparagin während der Biosynthese von CDA gezeigt.

B: Reaktive Eisen(III)-Spezies während der Halogenierung durch Nicht-Häm-Eisen- α -Ketoglutarat- O_2 -abhängige Halogenasen. Bis auf den gezeigten Schritt läuft der Halogenierungsmechanismus analog zum unter (A) gezeigten Hydroxylierungsmechanismus ab. Als Reaktionsbeispiel ist die SyrB2-katalysierte Chlorierung von auf der Peptidsynthetase SyrB1 immobilisiertem Threonin während der Syringomycin-Biosynthese gezeigt.

Dies ist allerdings keine generelle Strategie für C_β -Hydroxylierungen. So findet z.B. während der Biosynthese des Novobiocins eine durch die Häm-abhängige Oxygenase NovI katalysierte C_β -Hydroxylierung von Tyrosin statt, während dieses auf der Peptidsynthetase NovH immobilisiert ist (Abb. 5.12). Die Strategie der Modifizierung im PCP-gebundenen Zustand erlaubt einen kontrollierten Einbau der modifizierten Bausteine in die Sekundärmetabolite (siehe 5.3). Sie wird daher häufig verwendet, es gibt aber auch eine Reihe von Abweichungen von diesem Prinzip.

5.3.7 Schlussfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte die stereospezifische Biosynthese des 3-MeGlu-Restes der aziden Lipopeptide CDA, Daptomycin und A54145 unter ausschließlicher Verwendung von rekombinanten Enzymen des CDA-Produzenten *Streptomyces coelicolor* *in vitro* nachvollzogen werden. Die Charakterisierung der putativen Methyltransferase GlmT zusammen mit DptI aus *Streptomyces roseosporus* und LptI aus *Streptomyces fradiae* zeigte, dass es sich bei diesen Enzymen um SAM-abhängige α -Ketoglutarat-Methyltransferasen handelt, die die Bildung von (3R)-3-Methyl-2-Oxoglutarat katalysieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die verzweigtkettige Aminosäure-Transaminase IlvE aus *Streptomyces coelicolor* zumindest ein Kandidat unter den Transaminasen des Primärstoffwechsels ist, der in der Lage ist, die stereospezifische Transaminierung des Methylierungsprodukts zu (2S,3R)-3-MeGlu zu katalysieren.

Die hier gewonnenen Ergebnisse liefern zusammen mit früheren *in vivo*-Studien über die Komplementierung einer $\Delta glmT$ -Mutante von *Streptomyces coelicolor* (Milne et al., 2006) ein detailliertes Bild der Biosynthese und des Einbaus des 3-MeGlu-Restes in die aziden Lipopeptide (Abb. 5.17). Nach der Biosynthese des (2S,3R)-3-MeGlu wird dieser Baustein durch die A-Domäne des 3-MeGlu-inkorporierenden Moduls der NRPSs der aziden Lipopeptide erkannt und in das jeweilige Peptid eingebaut.

Da der 3-MeGlu-Rest in CDA, Daptomycin und A54145 eine große Bedeutung für die Bioaktivität der Antibiotika hat (siehe Abschnitt 1.4.2), ist der Baustein ein vielversprechendes Ziel für ein Engineering der Biosynthese der aziden Lipopeptide bezüglich des Einbaus von Glu, 3-MeGlu oder von weiteren Glu-Analoga.

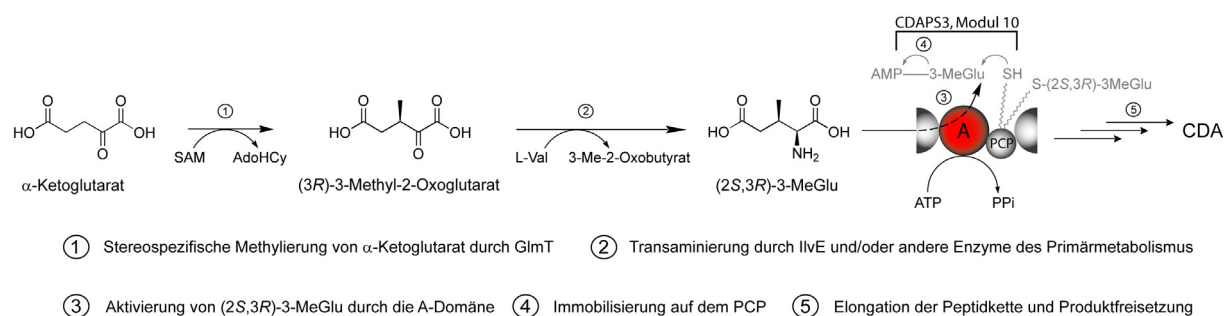


Abb. 5.17: Schematische Darstellung der Reaktionssequenz der (2S,3R)-3-MeGlu-Biosynthese und seines Einbaus in das CDA-Molekül.

Vom chemischen Standpunkt aus betrachtet ist die stereospezifische Funktionalisierung von Aminosäuren an der relativ unreaktiven β -Position eine synthetische Herausforderung. Dennoch gibt es einige Veröffentlichungen zur asymmetrischen Synthese von 3-MeGlu-Diastereomeren (Hartzoulakis und Gani, 1994; Soloshonok et al., 1999; Wehbe et al., 2003), und vor kurzem wurde eine konvergente mehrstufige Synthese aller möglichen Stereoisomere von 3-MeGlu publiziert (Milne et al., 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde durch eine *in vitro*-Verwendung der Methyltransferasen GlnT, DptI und LptI und der Transaminase IlvE eine Zweistufen-Synthese des (2S,3R)-3-MeGlu etabliert, bei der ausgehend von α -Ketoglutarat unter milden Bedingungen durch enzymatische Katalyse in wässriger Lösung zwei Stereozentren mit vollständiger Stereokontrolle aufgebaut werden. Auf diese Weise wird die Synthese dieses Stereoisomers wesentlich erleichtert. Möglicherweise kann die beschriebene Strategie auch zur Synthese weiterer C_β -funktionalisierter Aminosäuren benutzt werden. Dies könnte z.B. durch die Verwendung von SAM-Derivaten, die statt einer aktivierten Methylgruppe andere Alkylgruppen enthalten, geschehen, vorausgesetzt, die Methyltransferasen akzeptieren diese modifizierten Kosubstrate. Die modifizierten Aminosäuren könnten dann über chemoenzymatische Ansätze unter Verwendung von Zyklastasen in die aziden Lipopeptide eingebaut werden, welche anschließend durch ein Screening auf verbesserte Bioaktivität hin untersucht werden könnten. Möglicherweise lassen sich auf diese Weise neue azide Lipopeptide mit verbesserten oder neuen Aktivitäten finden.

6 Literatur

- Anteunis, M.J.O. and Van der Auwera, C. (1988) The remarkable sensitivity to acid-catalyzed peptolysis of peptide chains (endopeptolysis) having a succession of three N-alkylated amino acid residues. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **31**, 301-310.
- Attieh, J.M., Hanson, A.D. and Saini, H.S. (1995) Purification and characterization of a novel methyltransferase responsible for biosynthesis of halomethanes and methanethiol in *Brassica oleracea*. *J Biol Chem*, **270**, 9250-9257.
- Baltz, R.H., Brian, P., Miao, V. and Wrigley, S.K. (2005) Combinatorial biosynthesis of lipopeptide antibiotics in *Streptomyces roseosporus*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 1-9.
- Barna, J.C. and Williams, D.H. (1984) The structure and mode of action of glycopeptide antibiotics of the vancomycin group. *Annu Rev Microbiol*, **38**, 339-357.
- Barriere, J.C., Bacque, E., Puchault, G., Quenet, Y., Molherat, C., Cassayre, J. and Paris, J.M. (1998a) Reactivity of 1-(Des-3-Hydroxy-Picolinoyl) Pristinamycin IA. *Tetrahedron*, **54**, 12859-12886.
- Barriere, J.C., Berthaud, N., Beyer, D., Dutka-Malen, S., Paris, J.M. and Desnottes, J.F. (1998b) Recent developments in streptogramin research. *Curr Pharm Des*, **4**, 155-180.
- Belshaw, P.J., Walsh, C.T. and Stachelhaus, T. (1999) Aminoacyl-CoAs as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis. *Science*, **284**, 486-489.
- Bennett, J. and Scott, K.J. (1971) Quantitative staining of fraction I protein in polyacrylamide gels using Coomassie brilliant blue. *Anal Biochem*, **43**, 173-182.
- Benoiton, N.L., Lee, Y.C., Steinaur, R. and Chen, F.M. (1992) Studies on sensitivity to racemization of activated residues in couplings of N-benzyloxycarbonyldipeptides. *Int J Pept Protein Res*, **40**, 559-566.
- Bergendahl, V., Linne, U. and Marahiel, M.A. (2002) Mutational analysis of the C-domain in nonribosomal peptide synthesis. *Eur J Biochem*, **269**, 620-629.
- Blanc, V., Gil, P., Bamas-Jacques, N., Lorenzon, S., Zagorec, M., Schleuniger, J., Bisch, D., Blanche, F., Debussche, L., Crouzet, J. and Thibaut, D. (1997) Identification and analysis of genes from *Streptomyces pristinaespiralis* encoding enzymes involved in the biosynthesis of the 4-dimethylamino-L-phenylalanine precursor of pristinamycin I. *Mol Microbiol*, **23**, 191-202.
- Bordusa, F. (2001) Enzymes for peptide cyclization. *Chembiochem*, **2**, 405-409.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.
- Breuer, M., Ditrach, K., Habicher, T., Hauer, B., Kessler, M., Sturmer, R. and Zelinski, T. (2004) Industrial methods for the production of optically active intermediates. *Angew Chem Int Ed Engl*, **43**, 788-824.
- Bruner, S.D., Weber, T., Kohli, R.M., Schwarzer, D., Marahiel, M.A., Walsh, C.T. and Stubbs, M.T. (2002) Structural basis for the cyclization of the lipopeptide antibiotic surfactin by the thioesterase domain SrfTE. *Structure (Camb)*, **10**, 301-310.
- Cantoni, G.L. (1975) Biological methylation: selected aspects. *Annu Rev Biochem*, **44**, 435-451.
- Carter-Franklin, J.N. and Butler, A. (2004) Vanadium bromoperoxidase-catalyzed biosynthesis of halogenated marine natural products. *J Am Chem Soc*, **126**, 15060-15066.

- Challis, G.L. and Hopwood, D.A. (2003) Synergy and contingency as driving forces for the evolution of multiple secondary metabolite production by *Streptomyces* species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100 Suppl 2**, 14555-14561.
- Chambers, H.F. (1997) Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implications. *Clin Microbiol Rev*, **10**, 781-791.
- Chatterjee, C., Paul, M., Xie, L. and van der Donk, W.A. (2005) Biosynthesis and mode of action of lantibiotics. *Chem Rev*, **105**, 633-684.
- Cheng, X., Kumar, S., Posfai, J., Pflugrath, J.W. and Roberts, R.J. (1993) Crystal structure of the HhaI DNA methyltransferase complexed with S-adenosyl-L-methionine. *Cell*, **74**, 299-307.
- Chinali, G., Moureau, P. and Cocito, C.G. (1984) The action of virginiamycin M on the acceptor, donor, and catalytic sites of peptidyltransferase. *J Biol Chem*, **259**, 9563-9568.
- Clugston, S.L., Sieber, S.A., Marahiel, M.A. and Walsh, C.T. (2003) Chirality of peptide bond-forming condensation domains in nonribosomal peptide synthetases: the C5 domain of tyrocidine synthetase is a (D)C(L) catalyst. *Biochemistry*, **42**, 12095-12104.
- Cocito, C. (1979) Antibiotics of the virginiamycin family, inhibitors which contain synergistic components. *Microbiol Rev*, **43**, 145-192.
- Cocito, C., Di Giambattista, M., Nyssen, E. and Vannuffel, P. (1997) Inhibition of protein synthesis by streptogramins and related antibiotics. *J Antimicrob Chemother*, **39 Suppl A**, 7-13.
- Conti, E., Stachelhaus, T., Marahiel, M.A. and Brick, P. (1997) Structural basis for the activation of phenylalanine in the non-ribosomal biosynthesis of gramicidin S. *Embo J*, **16**, 4174-4183.
- Counter, F.T., Allen, N.E., Fukuda, D.S., Hobbs, J.N., Ott, J., Ensminger, P.W., Mynderse, J.S., Preston, D.A. and Wu, C.Y. (1990) A54145 a new lipopeptide antibiotic complex: microbiological evaluation. *J Antibiot (Tokyo)*, **43**, 616-622.
- Davies, J.S. (2003) The cyclization of peptides and depsipeptides. *J Pept Sci*, **9**, 471-501.
- de Crecy-Lagard, V., Blanc, V., Gil, P., Naudin, L., Lorenzon, S., Famechon, A., Bamas-Jacques, N., Crouzet, J. and Thibaut, D. (1997a) Pristinamycin I biosynthesis in *Streptomyces pristinaespiralis*: molecular characterization of the first two structural peptide synthetase genes. *J Bacteriol*, **179**, 705-713.
- de Crecy-Lagard, V., Saurin, W., Thibaut, D., Gil, P., Naudin, L., Crouzet, J. and Blanc, V. (1997b) Streptogramin B biosynthesis in *Streptomyces pristinaespiralis* and *Streptomyces virginiae*: molecular characterization of the last structural peptide synthetase gene. *Antimicrob Agents Chemother*, **41**, 1904-1909.
- Debono, M., Barnhart, M., Carrell, C.B., Hoffmann, J.A., Occolowitz, J.L., Abbott, B.J., Fukuda, D.S., Hamill, R.L., Biemann, K. and Herlihy, W.C. (1987) A21978C, a complex of new acidic peptide antibiotics: isolation, chemistry, and mass spectral structure elucidation. *J Antibiot (Tokyo)*, **40**, 761-777.
- Du, L., Sanchez, C., Chen, M., Edwards, D.J. and Shen, B. (2000) The biosynthetic gene cluster for the antitumor drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 supporting functional interactions between nonribosomal peptide synthetases and a polyketide synthase. *Chem Biol*, **7**, 623-642.
- Ehmann, D.E., Shaw-Reid, C.A., Losey, H.C. and Walsh, C.T. (2000) The EntF and EntE adenylation domains of *Escherichia coli* enterobactin synthetase: sequestration and selectivity in acyl-AMP transfers to thiolation domain cosubstrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 2509-2514.
- Eliopoulos, G.M. (2003) Quinupristin-dalfopristin and linezolid: evidence and opinion. *Clin Infect Dis*, **36**, 473-481.

- Entsch, B., Ballou, D.P. and Massey, V. (1976) Flavin-oxygen derivatives involved in hydroxylation by p-hydroxybenzoate hydroxylase. *J Biol Chem*, **251**, 2550-2563.
- Entsch, B., Husain, M., Ballou, D.P., Massey, V. and Walsh, C. (1980) Oxygen reactivity of p-hydroxybenzoate hydroxylase containing 1-deaza-FAD. *J Biol Chem*, **255**, 1420-1429.
- Fisher, S.H. (1989) Glutamate synthesis in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol*, **171**, 2372-2377.
- Fleming, A. (1929) On the antibacterial action of cultures of a penicillium, with a special reference to their use in the isolation of *B. influenzae*. *Brit. J. Exp. Path.*, **10**, 226-236.
- Fukuda, D.S., Du Bus, R.H., Baker, P.J., Berry, D.M., and Mynderse, J.S. (1990) A54145, a new lipopeptide antibiotic complex: isolation and characterization. *J. Antibiot. (Tokyo)*, **43**, 594-600.
- Garbe, D., Sieber, S.A., Bandur, N.G., Koert, U. and Marahiel, M.A. (2004) Enzymatic cyclisation of peptidomimetics with incorporated (E)-alkene dipeptide isosteres. *Chembiochem*, **5**, 1000-1003.
- Goto, M., Miyahara, I., Hayashi, H., Kagamiyama, H. and Hirotsu, K. (2003) Crystal structures of branched-chain amino acid aminotransferase complexed with glutamate and glutarate: true reaction intermediate and double substrate recognition of the enzyme. *Biochemistry*, **42**, 3725-3733.
- Grünwald, J., Kopp, F., Mählert, C., Linne, U., Sieber, S.A. and Marahiel, M.A. (2005) Fluorescence resonance energy transfer as a probe of peptide cyclization catalyzed by nonribosomal thioesterase domains. *Chem Biol*, **12**, 873-881.
- Grünwald, J., Mählert, C., Kopp, F. and Marahiel, M.A. (2006) Chemoenzymatic pathways towards novel peptide antibiotics. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, **5**, 227-243.
- Grünwald, J. and Marahiel, M.A. (2006) Chemoenzymatic and template-directed synthesis of bioactive macrocyclic peptides. *Microbiol Mol Biol Rev*, **70**, 121-146.
- Grünwald, J., Sieber, S.A., Mählert, C., Linne, U. and Marahiel, M.A. (2004a) Synthesis and derivatization of daptomycin: a chemoenzymatic route to acidic lipopeptide antibiotics. *J Am Chem Soc*, **126**, 17025-17031.
- Grünwald, J., Sieber, S.A. and Marahiel, M.A. (2004b) Chemo- and regioselective peptide cyclization triggered by the N-terminal fatty acid chain length: the recombinant cyclase of the calcium-dependent antibiotic from *Streptomyces coelicolor*. *Biochemistry*, **43**, 2915-2925.
- Haese, A., Schubert, M., M., H. and R., Z. (1993) Molecular characterization of the enniatin synthetase gene encoding a multifunctional enzyme catalyzing N-methyldepsipeptide formation in *Fusarium scirpi*. *Mol. Microbiol.*, **7**, 905-914.
- Hager, L.P., Morris, D.R., Brown, F.S. and Eberwein, H. (1966) Chloroperoxidase. II. Utilization of halogen anions. *J Biol Chem*, **241**, 1769-1777.
- Hahn, M. and Stachelhaus, T. (2004) Selective interaction between nonribosomal peptide synthetases is facilitated by short communication-mediating domains. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 15585-15590.
- Haltli, B., Tan, Y., Magarvey, N.A., Wagenaar, M., Yin, X., Greenstein, M., Hucul, J.A. and Zabriskie, T.M. (2005) Investigating beta-hydroxyenduracididine formation in the biosynthesis of the mannopeptimycins. *Chem Biol*, **12**, 1163-1168.
- Hansen, J.L., Moore, P.B. and Steitz, T.A. (2003) Structures of five antibiotics bound at the peptidyl transferase center of the large ribosomal subunit. *J Mol Biol*, **330**, 1061-1075.
- Harms, J.M., Schlunzen, F., Fucini, P., Bartels, H. and Yonath, A. (2004) Alterations at the peptidyl transferase centre of the ribosome induced by the synergistic action of the streptogramins dalbapristin and quinupristin. *BMC Biol*, **2**, 4-13.

- Hartzoulakis, B. and Gani, D. (1994) Syntheses of (2S,3R)- and (2S,3S)-3-methylglutamic acid. *J. Chem. Soc., Perkin Trans. 1*, 2525-2531.
- Hausinger, R.P. (2004) FeII/ α -ketoglutarate-dependent hydroxylases and related enzymes. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, **39**, 21-68.
- Heinzelmann, E., Berger, S., Puk, O., Reichenstein, B., Wohlleben, W. and Schwartz, D. (2003) A glutamate mutase is involved in the biosynthesis of the lipopeptide antibiotic friulimicin in *Actinoplanes friuliensis*. *Antimicrob Agents Chemother*, **47**, 447-457.
- Hendrickson, L., Davis, C.R., Roach, C., Nguyen, D.K., Aldrich, T., McAda, P.C. and Reeves, C.D. (1999) Lovastatin biosynthesis in *Aspergillus terreus*: characterization of blocked mutants, enzyme activities and a multifunctional polyketide synthase gene. *Chem Biol*, **6**, 429-439.
- Hilker, I., Rabani, G., Verzijl, G.K., Palmans, A.R. and Heise, A. (2006) Chiral polyesters by dynamic kinetic resolution polymerization. *Angew Chem Int Ed Engl*, **45**, 2130-2132.
- Hoeffler, D. and Zimmermann, U. (1997) Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant enterococci. *Lancet*, **350**, 739.
- Hojati, Z., Milne, C., Harvey, B., Gordon, L., Borg, M., Flett, F., Wilkinson, B., Sidebottom, P.J., Rudd, B.A., Hayes, M.A., Smith, C.P. and Micklefield, J. (2002) Structure, biosynthetic origin, and engineered biosynthesis of calcium-dependent antibiotics from *Streptomyces coelicolor*. *Chem Biol*, **9**, 1175-1187.
- Hornbogen, T., Riechers, S.P., Prinz, B., Schultchen, J., Lang, C., Schmidt, S., Mugge, C., Turkanovic, S., Sussmuth, R.D., Tauberger, E. and Zocher, R. (2007) Functional characterization of the recombinant N-methyltransferase domain from the multienzyme enniatin synthetase. *Chembiochem*, **8**, 1048-1054.
- Hoyer, K.M., Mahlert, C. and Marahiel, M.A. (2007) The iterative gramicidin S thioesterase catalyzes peptide ligation and cyclization. *Chem Biol*, **14**, 13-22.
- Huang, Y., Komoto, J., Konishi, K., Takata, Y., Ogawa, H., Gomi, T., Fujioka, M. and Takusagawa, F. (2000) Mechanisms for auto-inhibition and forced product release in glycine N-methyltransferase: crystal structures of wild-type, mutant R175K and S-adenosylhomocysteine-bound R175K enzymes. *J Mol Biol*, **298**, 149-162.
- Hubbard, B.K., Thomas, M.G. and Walsh, C.T. (2000) Biosynthesis of L-p-hydroxyphenylglycine, a non-proteinogenic amino acid constituent of peptide antibiotics. *Chem Biol*, **7**, 931-942.
- Inoue, K., Kuramitsu, S., Aki, K., Watanabe, Y., Takagi, T., Nishigai, M., Ikai, A. and Kagamiyama, H. (1988) Branched-chain amino acid aminotransferase of *Escherichia coli*: overproduction and properties. *J Biochem (Tokyo)*, **104**, 777-784.
- Jones, R.N. and Barry, A.L. (1987) Antimicrobial activity and spectrum of LY146032, a lipopeptide antibiotic, including susceptibility testing recommendations. *Antimicrob Agents Chemother*, **31**, 625-629.
- Jung, D., Rozek, A., Okon, M. and Hancock, R.E. (2004) Structural transitions as determinants of the action of the calcium-dependent antibiotic daptomycin. *Chem Biol*, **11**, 949-957.
- Kagamiyama, H. and Hayashi, H. (2000) Branched-chain amino-acid aminotransferase of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol*, **324**, 103-113.
- Kagan, H.M. and Meister, A. (1966) Stereospecific activity of glutamine synthetase toward threo-beta-methyl-D-glutamic acid. *Biochemistry*, **5**, 725-732.
- Kahne, D., Leimkuhler, C., Lu, W. and Walsh, C. (2005) Glycopeptide and lipoglycopeptide antibiotics. *Chem Rev*, **105**, 425-448.
- Kamigiri, K., Hidaka, T., Imai, S., Murakami, T. and Seto, H. (1992) Studies on the biosynthesis of bialaphos (SF-1293) 12. C-P bond formation mechanism of bialaphos: discovery of a P-methylation enzyme. *J Antibiot (Tokyo)*, **45**, 781-787.

- Keating, T.A., Marshall, C.G., Walsh, C.T. and Keating, A.E. (2002) The structure of VibH represents nonribosomal peptide synthetase condensation, cyclization and epimerization domains. *Nat Struct Biol*, **9**, 522-526.
- Kennedy, J., Auclair, K., Kendrew, S.G., Park, C., Vederas, J.C. and Hutchinson, C.R. (1999) Modulation of polyketide synthase activity by accessory proteins during lovastatin biosynthesis. *Science*, **284**, 1368-1372.
- Kessler, H., Kühn, M. and Löschner, T. (1986a) Synthese des Benzylethers von Virginiamycin S1. *Liebigs Annalen der Chemie*, 1-20.
- Kessler, H., Kühn, M. and Löschner, T. (1986b) Synthese von Virginiamycin S1 und Virginiamycin S4. *Liebigs Annalen der Chemie*, 21-31.
- Kim, H.B., Smith, C.P., Micklefield, J. and Mavituna, F. (2004) Metabolic flux analysis for calcium dependent antibiotic (CDA) production in *Streptomyces coelicolor*. *Metab Eng*, **6**, 313-325.
- Kim, T.Y. and Kim, H.J. (2001) Chiral separation of 9-fluorenylmethyl chloroformate- and dansyl chloride-derivatized D,L-serine by gamma-cyclodextrin-bonded high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, **933**, 99-106.
- King, D.S., Denny, C.T., Hochstrasser, R.M. and Smith, A.B. (1977) Synthesis of methionine carrying a chiral methyl group and its use in determining the steric course of the enzymatic C-methylation of indolepyruvate during indolmycin biosynthesis. *J Am Chem Soc*, **99**, 273-274.
- Kohli, R.M., Burke, M.D., Tao, J. and Walsh, C.T. (2003) Chemoenzymatic route to macrocyclic hybrid peptide/polyketide-like molecules. *J Am Chem Soc*, **125**, 7160-7161.
- Kohli, R.M., Takagi, J. and Walsh, C.T. (2002a) The thioesterase domain from a nonribosomal peptide synthetase as a cyclization catalyst for integrin binding peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 1247-1252.
- Kohli, R.M., Trauger, J.W., Schwarzer, D., Marahiel, M.A. and Walsh, C.T. (2001) Generality of peptide cyclization catalyzed by isolated thioesterase domains of nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry*, **40**, 7099-7108.
- Kohli, R.M. and Walsh, C.T. (2003) Enzymology of acyl chain macrocyclization in natural product biosynthesis. *Chem Commun (Camb)*, 297-307.
- Kohli, R.M., Walsh, C.T. and Burkart, M.D. (2002b) Biomimetic synthesis and optimization of cyclic peptide antibiotics. *Nature*, **418**, 658-661.
- Kolb, H.C., Finn, M.G. and Sharpless, K.B. (2001) Click Chemistry: Diverse Chemical Function from a Few Good Reactions. *Angew Chem Int Ed Engl*, **40**, 2004-2021.
- Konz, D. and Marahiel, M.A. (1999) How do peptide synthetases generate structural diversity? *Chem Biol*, **6**, R39-48.
- Kopp, F., Grünwald, J., Mählert, C. and Marahiel, M.A. (2006a) Chemoenzymatic design of acidic lipopeptide hybrids: new insights into the structure-activity relationship of daptomycin and A54145. *Biochemistry*, **45**, 10474-10481.
- Kopp, F., Mählert, C., Grünwald, J. and Marahiel, M.A. (2006b) Peptide macrocyclization: the reductase of the nostocyclopeptide synthetase triggers the self-assembly of a macrocyclic imine. *J Am Chem Soc*, **128**, 16478-16479.
- Kopp, F. and Marahiel, M.A. (2007) Macrocyclization strategies in polyketide and nonribosomal peptide biosynthesis. *Nat Prod Rep*, **24**, 735-749.
- Korczynska, M., Mukhtar, T.A., Wright, G.D. and Berghuis, A.M. (2007) Structural basis for streptogramin B resistance in *Staphylococcus aureus* by virginiamycin B lyase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **104**, 10388-10393.
- Kuzuyama, T., Hidaka, T., Kamigiri, K., Imai, S. and Seto, H. (1992) Studies on the biosynthesis of fosfomycin. 4. The biosynthetic origin of the methyl group of fosfomycin. *J Antibiot (Tokyo)*, **45**, 1812-1814.

- Kuzuyama, T., Seki, T., Dairi, T., Hidaka, T. and Seto, H. (1995) Nucleotide sequence of fortimicin KL1 methyltransferase gene isolated from *Micromonospora olivasterospora*, and comparison of its deduced amino acid sequence with those of methyltransferases involved in the biosynthesis of bialaphos and fosfomycin. *J Antibiot (Tokyo)*, **48**, 1191-1193.
- La Clair, J.J., Foley, T.L., Schegg, T.R., Regan, C.M. and Burkart, M.D. (2004) Manipulation of carrier proteins in antibiotic biosynthesis. *Chem Biol*, **11**, 195-201.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lambalot, R.H., Gehring, A.M., Flugel, R.S., Zuber, P., LaCelle, M., Marahiel, M.A., Reid, R., Khosla, C. and Walsh, C.T. (1996) A new enzyme superfamily - the phosphopantetheinyl transferases. *Chem Biol*, **3**, 923-936.
- LaVallie, E.R., DiBlasio, E.A., Kovacic, S., Grant, K.L., Schendel, P.F. and McCoy, J.M. (1993) A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm. *Biotechnology (N Y)*, **11**, 187-193.
- Le Goffic, F., Capmau, M.L., Abbe, J., Cerceau, C., Dublanchet, A. and Duval, J. (1977) Plasmid mediated pristinamycin resistance: PH 1A, a pristinamycin 1A hydrolase. *Ann Microbiol (Paris)*, **128B**, 471-474.
- Lin, H., Thayer, D.A., Wong, C.H. and Walsh, C.T. (2004) Macrolactamization of glycosylated peptide thioesters by the thioesterase domain of tyrocidine synthetase. *Chem Biol*, **11**, 1635-1642.
- Lin, H. and Walsh, C.T. (2004) A chemoenzymatic approach to glycopeptide antibiotics. *J Am Chem Soc*, **126**, 13998-14003.
- Lipmann, F. (1980) Bacterial production of antibiotic polypeptides by thiol-linked synthesis on protein templates. *Adv Microb Physiol*, **21**, 227-266.
- Lipmann, F., et al. (1971) Polypeptide synthesis on protein templates: the enzymatic synthesis of gramicidin S and tyrocidine. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.*, **35**, 1-34.
- Luo, L., Kohli, R.M., Onishi, M., Linne, U., Marahiel, M.A. and Walsh, C.T. (2002) Timing of epimerization and condensation reactions in nonribosomal peptide assembly lines: kinetic analysis of phenylalanine activating elongation modules of tyrocidine synthetase B. *Biochemistry*, **41**, 9184-9196.
- Magarvey, N.A., Haltli, B., He, M., Greenstein, M. and Hucul, J.A. (2006) Biosynthetic pathway for mannopeptimycins, lipoglycopeptide antibiotics active against drug-resistant gram-positive pathogens. *Antimicrob Agents Chemother*, **50**, 2167-2177.
- Marahiel, M.A., Stachelhaus, T. and Mootz, H.D. (1997) Modular Peptide Synthetases Involved in Nonribosomal Peptide Synthesis. *Chem Rev*, **97**, 2651-2674.
- Martin, J.L. and McMillan, F.M. (2002) SAM (dependent) I AM: the S-adenosylmethionine-dependent methyltransferase fold. *Curr Opin Struct Biol*, **12**, 783-793.
- Martin-Matute, B. and Backvall, J.E. (2007) Dynamic kinetic resolution catalyzed by enzymes and metals. *Curr Opin Chem Biol*, **11**, 226-232.
- Mascaro, L., Jr., Horhammer, R., Eisenstein, S., Seller, L.K., Mascaro, K. and Floss, H.G. (1977) Synthesis of methionine carrying a chiral methyl group and its use in determining the steric course of the enzymatic C-methylation of indolepyruvate during indolmycin biosynthesis. *J Am Chem Soc*, **99**, 273-274.
- Massey, V. (1994) Activation of molecular oxygen by flavins and flavoproteins. *J Biol Chem*, **269**, 22459-22462.
- Matthews, R.G. (2001) Cobalamin-dependent methyltransferases. *Acc Chem Res*, **34**, 681-689.
- May, J.J., Kessler, N., Marahiel, M.A. and Stubbs, M.T. (2002) Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 12120-12125.

- May, J.J., Wendrich, T.M. and Marahiel, M.A. (2001) The *dhb* operon of *Bacillus subtilis* encodes the biosynthetic template for the catecholic siderophore 2,3-dihydroxybenzoate-glycine-threonine trimeric ester bacillibactin. *J Biol Chem*, **276**, 7209-7217.
- Miao, V., Brost, R., Chapple, J., She, K., Gal, M.F. and Baltz, R.H. (2006) The lipopeptide antibiotic A54145 biosynthetic gene cluster from *Streptomyces fradiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, **33**, 129-140.
- Miao, V., Coeffet-Legal, M.F., Brian, P., Brost, R., Penn, J., Whiting, A., Martin, S., Ford, R., Parr, I., Bouchard, M., Silva, C.J., Wrigley, S.K. and Baltz, R.H. (2005) Daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*: cloning and analysis of the gene cluster and revision of peptide stereochemistry. *Microbiology*, **151**, 1507-1523.
- Micklefield, J. (2004) Daptomycin structure and mechanism of action revealed. *Chem Biol*, **11**, 887-888.
- Miller, D.A., Luo, L., Hillson, N., Keating, T.A. and Walsh, C.T. (2002) Yersiniabactin synthetase: a four-protein assembly line producing the nonribosomal peptide/polyketide hybrid siderophore of *Yersinia pestis*. *Chem Biol*, **9**, 333-344.
- Miller, D.A., Walsh, C.T. and Luo, L. (2001) C-methyltransferase and cyclization domain activity at the intraprotein PK/NRP switch point of yersiniabactin synthetase. *J Am Chem Soc*, **123**, 8434-8435.
- Milne, C., Powell, A., Jim, J., Al Nakeeb, M., Smith, C.P. and Micklefield, J. (2006) Biosynthesis of the (2S,3R)-3-methyl glutamate residue of nonribosomal lipopeptides. *J Am Chem Soc*, **128**, 11250-11259.
- Mootz, H.D., Schwarzer, D. and Marahiel, M.A. (2002) Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. *Chembiochem*, **3**, 490-504.
- Morris, D.R. and Hager, L.P. (1966) Chloroperoxidase. I. Isolation and properties of the crystalline glycoprotein. *J Biol Chem*, **241**, 1763-1768.
- Mukhtar, T.A., Koteva, K.P., Hughes, D.W. and Wright, G.D. (2001) Vgb from *Staphylococcus aureus* inactivates streptogramin B antibiotics by an elimination mechanism not hydrolysis. *Biochemistry*, **40**, 8877-8886.
- Mukhtar, T.A., Koteva, K.P. and Wright, G.D. (2005) Chimeric streptogramin-tyrocidine antibiotics that overcome streptogramin resistance. *Chem Biol*, **12**, 229-235.
- Mukhtar, T.A. and Wright, G.D. (2005) Streptogramins, oxazolidinones, and other inhibitors of bacterial protein synthesis. *Chem Rev*, **105**, 529-542.
- Namwat, W., Kamioka, Y., Kinoshita, H., Yamada, Y. and Nihira, T. (2002a) Characterization of virginiamycin S biosynthetic genes from *Streptomyces virginiae*. *Gene*, **286**, 283-290.
- Namwat, W., Kinoshita, H. and Nihira, T. (2002b) Identification by heterologous expression and gene disruption of VisA as L-lysine 2-aminotransferase essential for virginiamycin S biosynthesis in *Streptomyces virginiae*. *J Bacteriol*, **184**, 4811-4818.
- Neary, J.M., Powell, A., Gordon, L., Milne, C., Flett, F., Wilkinson, B., Smith, C.P. and Micklefield, J. (2007) An asparagine oxygenase (AsnO) and a 3-hydroxyasparaginyl phosphotransferase (HasP) are involved in the biosynthesis of calcium-dependent lipopeptide antibiotics. *Microbiology*, **153**, 768-776.
- Nguyen, K.T., Kau, D., Gu, J.Q., Brian, P., Wrigley, S.K., Baltz, R.H. and Miao, V. (2006) A glutamic acid 3-methyltransferase encoded by an accessory gene locus important for daptomycin biosynthesis in *Streptomyces roseosporus*. *Mol Microbiol*, **61**, 1294-1307.
- Okada, K., Hirotsu, K., Hayashi, H. and Kagamiyama, H. (2001) Structures of *Escherichia coli* branched-chain amino acid aminotransferase and its complexes with 4-methylvalerate and 2-methylleucine: induced fit and substrate recognition of the enzyme. *Biochemistry*, **40**, 7453-7463.

- Ondetti, M.A. and Thomas, P.L. (1965) Synthesis of a peptide lactone related to vernamycin B- α . *J Am Chem Soc*, **87**, 4373-4380.
- Pacholec, M., Tao, J. and Walsh, C.T. (2005) CouO and NovO: C-methyltransferases for tailoring the aminocoumarin scaffold in coumermycin and novobiocin antibiotic biosynthesis. *Biochemistry*, **44**, 14969-14976.
- Pechere, J.C. (1996) Streptogramins. A unique class of antibiotics. *Drugs*, **51 Suppl 1**, 13-19.
- Porse, B.T. and Garrett, R.A. (1999) Sites of interaction of streptogramin A and B antibiotics in the peptidyl transferase loop of 23 S rRNA and the synergism of their inhibitory mechanisms. *J Mol Biol*, **286**, 375-387.
- Preud'homme, J., Tarridec, P. and Belloc, A. (1968) [90. Isolation, characterization and identification of the components of pristinamycin]. *Bull Soc Chim Fr*, **2**, 585-591.
- Quadri, L.E., Weinreb, P.H., Lei, M., Nakano, M.M., Zuber, P. and Walsh, C.T. (1998) Characterization of Sfp, a *Bacillus subtilis* phosphopantetheinyl transferase for peptidyl carrier protein domains in peptide synthetases. *Biochemistry*, **37**, 1585-1595.
- Raja, A., LaBonte, J., Lebbos, J., and Kirkpatrick, P. (2003) Daptomycin. *Nat Rev Drug Discov*, **2**, 943-944.
- Reed, J.W. and Kingston, D.G. (1986) Biosynthesis of antibiotics of the virginiamycin family, 5. The conversion of phenylalanine to phenylglycine in the biosynthesis of virginiamycin S1. *J Nat Prod*, **49**, 626-630.
- Robinson, J.L., Taylor, R.E., Liotta, L.A., Bolla, M.L., Azevedo, E.V., Medina, I. and McAlpine, S.R. (2004) A progressive synthetic strategy for class B synergimycins. *Tetrahedron Letters*, **45**, 2147-2150.
- Rodriguez-Fonseca, C., Amils, R. and Garrett, R.A. (1995) Fine structure of the peptidyl transferase centre on 23 S-like rRNAs deduced from chemical probing of antibiotic-ribosome complexes. *J Mol Biol*, **247**, 224-235.
- Rostovtsev, V.V., Green, L.G., Fokin, V.V. and Sharpless, K.B. (2002) A stepwise Huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew Chem Int Ed Engl*, **41**, 2596-2599.
- Samel, S.A., Schoenafinger, G., Knappe, T.A., Marahiel, M.A. and Essen, L.O. (2007) Structural and functional insights into a peptide bond-forming bidomain from a nonribosomal peptide synthetase. *Structure*, **15**, 781-792.
- Samel, S.A., Wagner, B., Marahiel, M.A. and Essen, L.O. (2006) The thioesterase domain of the fengycin biosynthesis cluster: a structural base for the macrocyclization of a non-ribosomal lipopeptide. *J Mol Biol*, **359**, 876-889.
- Schauwecker, F., Pfennig, F., Grammel, N. and Keller, U. (2000) Construction and in vitro analysis of a new bi-modular polypeptide synthetase for synthesis of N-methylated acyl peptides. *Chem Biol*, **7**, 287-297.
- Schneider, T.L. and Walsh, C.T. (2004) Portability of oxidase domains in nonribosomal peptide synthetase modules. *Biochemistry*, **43**, 15946-15955.
- Schracke, N., Linne, U., Mahlert, C. and Marahiel, M.A. (2005) Synthesis of linear gramicidin requires the cooperation of two independent reductases. *Biochemistry*, **44**, 8507-8513.
- Schubert, H.L., Blumenthal, R.M. and Cheng, X. (2003) Many paths to methyltransfer: a chronicle of convergence. *Trends Biochem Sci*, **28**, 329-335.
- Schwarzer, D., Finking, R. and Marahiel, M.A. (2003) Nonribosomal peptides: from genes to products. *Nat Prod Rep*, **20**, 275-287.
- Schwarzer, D., Mootz, H.D., Linne, U. and Marahiel, M.A. (2002) Regeneration of misprimed nonribosomal peptide synthetases by type II thioesterases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 14083-14088.
- Sewald, N. and Jakubke, H. (2002a) Peptides: Chemistry and Biology. Wiley VCH: Weinheim; p 313.

- Sewald, N. and Jakubke, H. (2002b) Peptides: Chemistry and Biology. Wiley VCH: Weinheim; pp 205-206.
- Shaginian, A., Rosen, M.C., Binkowski, B.F. and Belshaw, P.J. (2004) Solid-phase synthesis of dihydrovirginiamycin S1, a streptogramin B antibiotic. *Chemistry*, **10**, 4334-4340.
- Sieber, S.A. and Marahiel, M.A. (2003) Learning from nature's drug factories: nonribosomal synthesis of macrocyclic peptides. *J Bacteriol*, **185**, 7036-7043.
- Sieber, S.A. and Marahiel, M.A. (2005) Molecular mechanisms underlying nonribosomal Peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chem Rev*, **105**, 715-738.
- Sieber, S.A., Tao, J., Walsh, C.T. and Marahiel, M.A. (2004) Peptidyl thiophenols as substrates for nonribosomal peptide cyclases. *Angew Chem Int Ed Engl*, **43**, 493-498.
- Sieber, S.A., Walsh, C.T. and Marahiel, M.A. (2003) Loading peptidyl-coenzyme A onto peptidyl carrier proteins: a novel approach in characterizing macrocyclization by thioesterase domains. *J Am Chem Soc*, **125**, 10862-10866.
- Sofia, H.J., Chen, G., Hetzler, B.G., Reyes-Spindola, J.F. and Miller, N.E. (2001) Radical SAM, a novel protein superfamily linking unresolved steps in familiar biosynthetic pathways with radical mechanisms: functional characterization using new analysis and information visualization methods. *Nucleic Acids Res*, **29**, 1097-1106.
- Soloshonok, V.A., Cai, C., Hruby, V.J., Meervelt, L.V. and Mischenko, N. (1999) Stereochemically defined C-substituted glutamic acids and their derivatives. 1. An efficient asymmetric synthesis of (2S,3S)-3-methyl- and -3-trifluoromethylpyroglutamic acids. *Tetrahedron*, **55**, 12031-12044.
- Stachelhaus, T., Huser, A. and Marahiel, M.A. (1996) Biochemical characterization of peptidyl carrier protein (PCP), the thiolation domain of multifunctional peptide synthetases. *Chem Biol*, **3**, 913-921.
- Stachelhaus, T., Mootz, H.D., Bergendahl, V. and Marahiel, M.A. (1998) Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain. *J Biol Chem*, **273**, 22773-22781.
- Stachelhaus, T., Mootz, H.D. and Marahiel, M.A. (1999) The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. *Chem Biol*, **6**, 493-505.
- Stachelhaus, T. and Walsh, C.T. (2000) Mutational analysis of the epimerization domain in the initiation module PheATE of gramicidin S synthetase. *Biochemistry*, **39**, 5775-5787.
- Stein, D.B., Linne, U., Hahn, M. and Marahiel, M.A. (2006) Impact of epimerization domains on the intermodular transfer of enzyme-bound intermediates in nonribosomal peptide synthesis. *Chembiochem*, **7**, 1807-1814.
- Stein, D.B., Linne, U. and Marahiel, M.A. (2005) Utility of epimerization domains for the redesign of nonribosomal peptide synthetases. *Febs J*, **272**, 4506-4520.
- Strieker, M., Kopp, F., Mahlert, C., Essen, L.O. and Marahiel, M.A. (2007) Mechanistic and structural basis of stereospecific C β -hydroxylation in calcium-dependent antibiotic, a daptomycin-type lipopeptide. *ACS Chem Biol*, **2**, 187-196.
- Tally, F.P. and DeBruin, M.F. (2000) Development of daptomycin for gram-positive infections. *J Antimicrob Chemother*, **46**, 523-526.
- Taurog, A. and Howells, E.M. (1966) Enzymatic iodination of tyrosine and thyroglobulin with chloroperoxidase. *J Biol Chem*, **241**, 1329-1339.
- Tenson, T., Lovmar, M. and Ehrenberg, M. (2003) The mechanism of action of macrolides, lincosamides and streptogramin B reveals the nascent peptide exit path in the ribosome. *J Mol Biol*, **330**, 1005-1014.
- Thern, B., Rudolph, J. and Jung, G. (2002) Total synthesis of the nematocidal cyclododecapeptide omphalotin A by using racemization-free triphosgene-mediated couplings in the solid phase. *Angew Chem Int Ed Engl*, **41**, 2307-2309.

- Thibaut, D., Bisch, D., Ratet, N., Maton, L., Couder, M., Debussche, L. and Blanche, F. (1997) Purification of peptide synthetases involved in pristinamycin I biosynthesis. *J Bacteriol*, **179**, 697-704.
- Trauger, J.W., Kohli, R.M., Mootz, H.D., Marahiel, M.A. and Walsh, C.T. (2000) Peptide cyclization catalysed by the thioesterase domain of tyrocidine synthetase. *Nature*, **407**, 215-218.
- Trauger, J.W., Kohli, R.M. and Walsh, C.T. (2001) Cyclization of backbone-substituted peptides catalyzed by the thioesterase domain from the tyrocidine nonribosomal peptide synthetase. *Biochemistry*, **40**, 7092-7098.
- Tseng, C.C., Bruner, S.D., Kohli, R.M., Marahiel, M.A., Walsh, C.T. and Sieber, S.A. (2002) Characterization of the surfactin synthetase C-terminal thioesterase domain as a cyclic depsipeptide synthase. *Biochemistry*, **41**, 13350-13359.
- Turner, N.J. (2004) Enzyme catalysed deracemisation and dynamic kinetic resolution reactions. *Curr Opin Chem Biol*, **8**, 114-119.
- Vaillancourt, F.H., Yeh, E., Vosburg, D.A., Garneau-Tsodikova, S. and Walsh, C.T. (2006) Nature's inventory of halogenation catalysts: oxidative strategies predominate. *Chem Rev*, **106**, 3364-3378.
- Vaillancourt, F.H., Yin, J. and Walsh, C.T. (2005) SyrB2 in syringomycin E biosynthesis is a nonheme FeII alpha-ketoglutarate- and O₂-dependent halogenase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 10111-10116.
- Vannuffel, P. and Cocito, C. (1996) Mechanism of action of streptogramins and macrolides. *Drugs*, **51 Suppl 1**, 20-30.
- Velkov, T. and Lawen, A. (2003) Non-ribosomal peptide synthetases as technological platforms for the synthesis of highly modified peptide bioeffectors--Cyclosporin synthetase as a complex example. *Biotechnol Annu Rev*, **9**, 151-197.
- Vendrell, J. and Aviles, F.X. (1986) Complete Amino Acid Analysis of Proteins by Dabsyl Derivatization and Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography*, **358**, 401-413.
- Wagner, B. (2006) Chemoenzymatische Synthese von Bacitracin-Derivaten und Untersuchungen zur Optimierung der in vitro Zyklisierung des Surfactins. *Dissertation*, Fachbereich Chemie, Philipps-Universität Marburg.
- Wagner, B., Schumann, D., Linne, U., Koert, U. and Marahiel, M.A. (2006) Rational design of bacitracin A derivatives by incorporating natural product derived heterocycles. *J Am Chem Soc*, **128**, 10513-10520.
- Walsh, C.T. (2000) Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, **406**, 775-781.
- Walsh, C.T. (2004) Polyketide and nonribosomal peptide antibiotics: modularity and versatility. *Science*, **303**, 1805-1810.
- Walsh, C.T., Chen, H., Keating, T.A., Hubbard, B.K., Losey, H.C., Luo, L., Marshall, C.G., Miller, D.A. and Patel, H.M. (2001) Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. *Curr Opin Chem Biol*, **5**, 525-534.
- Weber, G., Schorgendorfer, K., Schneider-Scherzer, E. and Leitner, E. (1994) The peptide synthetase catalyzing cyclosporine production in *Tolypocladium niveum* is encoded by a giant 45.8-kilobase open reading frame. *Curr Genet*, **26**, 120-125.
- Weckwerth, W., Miyamoto, K., Iinuma, K., Krause, M., Glinski, M., Storm, T., Bonse, G., Kleinkauf, H. and Zocher, R. (2000) Biosynthesis of PF1022A and related cyclooctadepsipeptides. *J Biol Chem*, **275**, 17909-17915.
- Wehbe, J., Rolland, V., Roumestant, M.L. and Martinez, J. (2003) Glutamate transporter blockers: enantiomerically pure (2S,3S)- and (2S,3R)-3-methyl glutamic acids. *Tetrahedron: Asymmetry*, **14**, 1123-1126.

- Westrich, L., Heide, L. and Li, S.M. (2003) CloN6, a novel methyltransferase catalysing the methylation of the pyrrole-2-carboxyl moiety of clorobiocin. *Chembiochem*, **4**, 768-773.
- Williams, D.H., Williamson, M.P., Butcher, D.W., and Hammond, S.J. (1983) Detailed binding sites of the antibiotics Vancomycin and Ristocetin A: Determination of intermolecular distances in antibiotic/substrate complexes by use of the time-dependent Nuclear Overhauser Effect (NOE). *J Am Chem Soc*, **105**, 1332-1339.
- Wohlleben, W. and Pelzer, S. (2002) New compounds by combining "modern" genomics and "old-fashioned" mutasynthesis. *Chem Biol*, **9**, 1163-1164.
- Wu, J.C. and Santi, D.V. (1987) Kinetic and catalytic mechanism of HhaI methyltransferase. *J Biol Chem*, **262**, 4778-4786.
- Wyckoff, E.E., Stoebner, J.A., Reed, K.E. and Payne, S.M. (1997) Cloning of a *Vibrio cholerae* vibriobactin gene cluster: identification of genes required for early steps in siderophore biosynthesis. *J Bacteriol*, **179**, 7055-7062.
- Xian, M., Alaux, S., Sagot, E. and Gefflaut, T. (2007) Chemoenzymatic Synthesis of Glutamic Acid Analogues: Substrate Specificity and Synthetic Applications of Branched Chain Aminotransferase from *Escherichia coli*. *J Org Chem*.
- Yeh, E., Garneau, S. and Walsh, C.T. (2005) Robust in vitro activity of RebF and RebH, a two-component reductase/halogenase, generating 7-chlorotryptophan during rebeccamycin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 3960-3965.
- Yeh, E., Kohli, R.M., Bruner, S.D. and Walsh, C.T. (2004a) Type II thioesterase restores activity of a NRPS module stalled with an aminoacyl-S-enzyme that cannot be elongated. *Chembiochem*, **5**, 1290-1293.
- Yeh, E., Lin, H., Clugston, S.L., Kohli, R.M. and Walsh, C.T. (2004b) Enhanced macrocyclizing activity of the thioesterase from tyrocidine synthetase in presence of nonionic detergent. *Chem Biol*, **11**, 1573-1582.
- Yin, J., Liu, F., Li, X. and Walsh, C.T. (2004) Labeling proteins with small molecules by site-specific posttranslational modification. *J Am Chem Soc*, **126**, 7754-7755.
- Zocher, R., Keller, U. and Kleinkauf, H. (1983) Mechanism of depsipeptide formation catalyzed by enniatin synthetase. *Biochem Biophys Res Commun*, **110**, 292-299.
- Zocher, R., Nihira, T., Paul, E., Madry, N., Peeters, H., Kleinkauf, H. and Keller, U. (1986) Biosynthesis of cyclosporin A: partial purification and properties of a multifunctional enzyme from *Tolypocladium inflatum*. *Biochemistry*, **25**, 550-553.

7 Anhang

7.1 Biosynthesegencluster der aziden Lipopeptide

Die folgenden Abbildungen zeigen schematische Darstellungen der Biosynthesegencluster von CDA, Daptomycin und A54145. Eine schematische Darstellung der Funktion einiger der für die Biosynthese nichtproteinogener Aminosäuren zuständigen Enzyme zeigt Abb. 7.4.

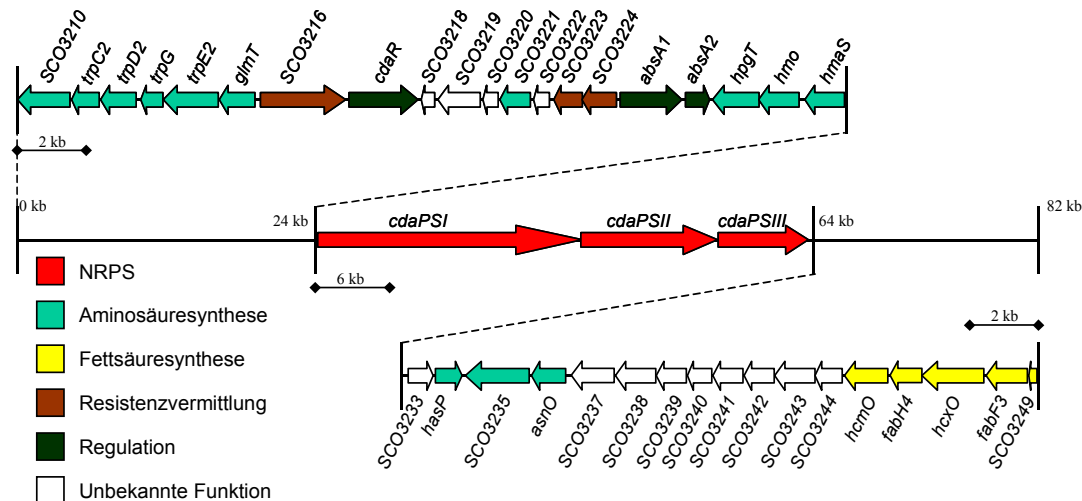


Abbildung 7.1: Organisation des CDA-Biosynthesegenclusters aus *Streptomyces coelicolor* (Hojati et al., 2002).

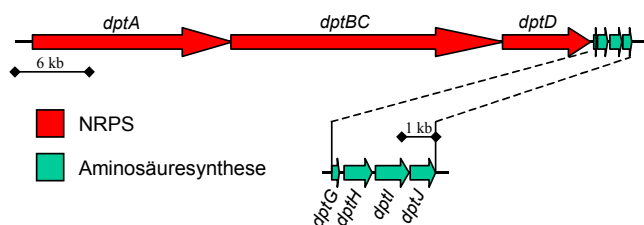


Abbildung 7.2: Auszug aus dem Daptomycin-Biosynthesegencluster aus *Streptomyces roseosporus* (Miao et al., 2005).

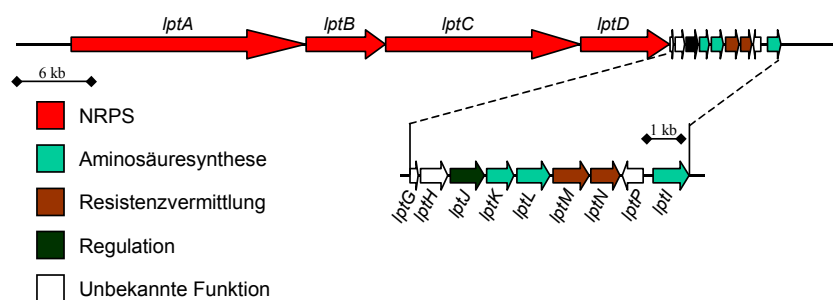


Abbildung 7.3: Auszug aus dem A54145-Biosynthesegencluster aus *Streptomyces fradiae* (Miao et al., 2006).

7.2 Biosynthese weiterer Aminosäuren der aziden Lipopeptide

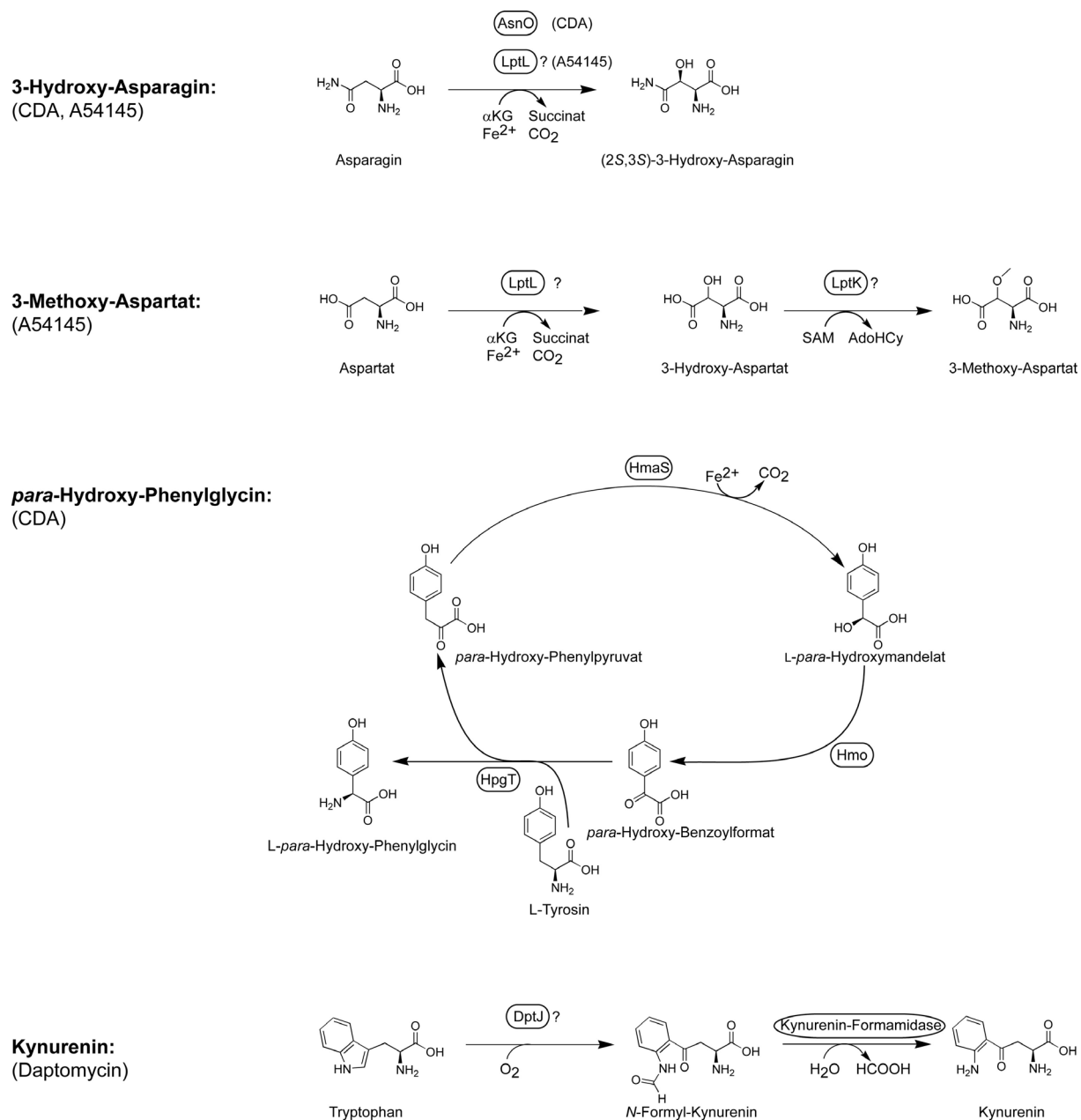


Abbildung 7.4: Biosynthese weiterer nichtproteinogener Aminosäuren der aziden Lipopeptide (Hojati et al., 2002; Hubbard et al., 2000; Miao et al., 2006; Miao et al., 2005; Strieker et al., 2007).

Enzymatische Schritte, zu denen experimentelle Daten fehlen, sind mit einem Fragezeichen markiert.

7.3 Sequenzen der zur Konstruktion der Expressionsplasmide verwendeten PCR-Amplifikate

Im folgenden sind die DNA-Sequenzen der für die Herstellung der Expressionsplasmide verwendeten PCR-Amplifikate aufgeführt. Die Sequenzen der jeweiligen Primer sind in Kleinbuchstaben dargestellt.

a) *snbDE-TE* für die Klonierung im Vektor pBAD202/D-Topo

5' caccggcgccgacacgggcCACGACCCCTTCGGCGTGCTGCTGCCGCTGCGCACCGGCGGCAGCCGCGCCCC
CTGTTCTGCGTCCACCCCGCCGGCTTCGGCTGGGTCTACTCCGCACTGCTGCGCCACACCGACCGCGAACAG
CCCCTGTACGCCCTCCAGGCACGCGGCTGGCCCGCCCCGAGCCACTGCCCGACGACATCGACGCCATGGCCCCG
GACTACGCAGAACAGATCCGCAAAACGGTGCCCGAGGGCCCCCTACGAGATCCTCGGCTGGTCCTTCGGCGGCCCTC
GTCGCCCCACGCCGTCGCGCCCGCCTGCAGGCCGAGGGCGCCGAAGTGAGCCTGCTGGCCGTCCTCGACGGCTAC
CCCGACGCCTACGACGGCACCGAGCACGAGGTCGGCGAGGAACAGGTCCTGGCGATCCTCCTCAACGCCGCCGGC
GTCGACCGGGCCAGGCCTTCGGCGACGCCCCCTCCAACGGGCCGCCGTGCTCGAGAAGCTGCGCGACAGCGGC
AGCGCCCTGGGCAACCTCGACGACGACGCGGTGCGCCGATGGTCACCGTCTTCCTCAACAACACGCGCCTCATC
CAGAACTTCCGGCCCCGGCGGTTTACCGGCGACATGGTGTTCTTCGCGCCGCCGCCGGCCACCACGACCCGGCG
CTCACCCCGGCAACTGGCGCCCCCTACGTCACCGGGCGGATCGAGGAGCACCACCTGGACACCGACCATGCGGCG
CTGGCCCGGCCGAGGCCCTGGGCGCCGTGCCCCGACGCTGGCACAGCGCGACACGccgcaggccggccac3'

b) *glmT* für die Klonierung im Vektor pCB28(a+)

5' aaaaaaccatggtgaccggggacgacgtgcaggggCAGCTGGCGGAAGTGCGGCGGAGCCACCCGAGCTGCA
CGCCCTGGCCGACCCCGGCGGATCGCCGCCTGGGAGGCGGCCAGGGGCGAGCGCCCCCGGGCGGCACGACGACTT
CGGCGCCGACGGCGAGGGCAGCCGGGGCGTGAGTACGTACAGGCCAGGCCCTCAACCGGCGCGCCCGCGAGAC
GGGGATCAGGAAGCTCCTCGGCTTCGCCGAGACCGCCCCGCCGACCGCGGCCGGCGACCGGCCCGTCTCGGTGCA
CCTGCTCGGCGGCGACGGAAGTGGTGCGCAAGGTCTGCGAGGAGCTGGGCATCGGCGACTTCAACATCCTCACCTG
CGACGCGTCCCCCACATGGTGACCACGGCGTGGGCGGCCGGCGTGCCCGCCCTGCTCCAGCGGGCCGAGCAGCC
GCTGCTGCGCGACCACAGCGTCGACGCCGTACTGCTGGCCTACGGCTCGCACCACGTGCCGTCTCGGACCGGCA
GACGGTGGCCACCGAGGCCCGCCGGATGCTCCGCCCGGCGGCACGTTCTGCTGACGACTTCTCGTCGGCTC
GCCCGTGGACGTGTGGTTCGAGGAGGTACCGACGTGTACTCGGCGACCGGCCACAAGTTCTGCACTTACCCG
GGAGAGATCGAGGGATACCTGGAGAAGGCGCGGTACGACACCGCGAGGTCTGAGATCGACGACCCCTACAC
CGCGTTCGCGGCGCACCCCGAGGAGGCGGAGTGGAGATCGGCCGTACCTGCTGAACATGTACGGCCTGGTCAA
GGTCTTCGAGGGGCGCACCGAGCAGGAGGCGTACCGTGGGTGCGCGAGACCGCAAGGCCGTCTTCGCTACCC
GGACGCCGAGGGCGGCCTCGCCTCGAGCGAACTGCGCCAGGAGGGCACCGGCCGGGTGGCGCGTACCATTTCCGCG
GCGTGCCGTGCTCGGAGTGGGCGGGTCTcgggccaccgcccgggaaggcggaagctttttttt3'

c) *dptI* für die Klonierung im Vektor pCB28(a+)

5' aaaaaaccatggtgaccggcgaaaccgcaccacCACCTACCTCCCCGGCATGACCGTGCACGACTACCACGT
GACCGTCAAGGAACAGCACCCGGCGCTCTTCGAGCTCCTGGACCCCGCACGCCTCGTCGCCGTACGGACGAGCC
TTGGGTACCGAGGGAAACGAGTTTCGACGACGACCACGCCGGCCGCGGCGTCTCCTACCGCTGTGCCCAGCAGCA
CGGCGAAGCCCGCCGACCGGCATTGAGACGATTCTCGGCATGTTGCGCGGCCCGGGCGGTGCGCGACATGGG
CCGTGTCTAGATGTACTCGGAGGCGAAGGCCTGCTCAGCCGCGTGTGGCGGCAACTGGCCGGCGCCGGCGACGG
GGACTCCGTGCCACTGGTACCGGAGACCTCAGCGGCCACATGGTGGCCGACGCCCTCCGGTCCGGCCTGCCCGC
CGTACGCCAGCCGGCCGACCGCATGCTGCAGCGAGACCACTGCCTGGACGGCGTGCTCTTCGCGTACGGCACTCA
CCACGTGACCGCTCTGTACGCCCCCGCATGCTGACAGAGGCCTCCCGGGTCTGGCCCCCTGGAGGCCGCGTCTGT
CCTCCACGACTTCGCGGAGGGATCCCCCGAAGAACGCTGGTTCCGCGAAGTCTGTCACCCCGCTCCCTCGCGGG
CCACGCGTACGACCACTTACCGCCCCACGAGATGACCGGTACCTCGCCGACCGGGCTTACCGGACATCACCGT
CGGCCCCGTGTACGACCCGATGACCGTGACCGGGGAGACCGACGAGAGCGCACTGGCTCGGCTCGTCTCTACAT
GACCTCGATGTACGGCATCCTGCCCGACGGCGACCGGAGCAACGAGCGGACGGAAGCCGCCCTCCGCGACATCTT
CCGTTTCTCGGCCGGCGACCTCCCCGAGGACGTCCCCCGCGACGAGGCGGTCTGGAACCTTACCGTCCGTCCGCA
CGGCAATGCCTTCCGGGCCGAGCTCCCCCGGATAGCCCTcgctcgccacggacgcaaaccaagctttttttt3'

d) *lptI* für die Klonierung im Vektor pCB28(a+)

5' aaaaaaggatccatgcaggcggtatgcaccggcggaacaaaaacaggaacagaaacctaacttaccgtccctga
gtctcgaagactatctgcgcgacacgggttccggccccacccggctcctgaaatcgtccgtggatttcggccgcccag
gctctgatgaagcgctcagagcactggccgacgacaccacggaattcgaattccgacgagaccggacgcgcgaca
cctatcgcagggccagcagcagaccctccgtccgttgagggggaatgcgacaactgctcgaactggccgccccct
cccgccccctccgacacggccgcccccccgacccgtcctcgacgttctggcggggacggaaccatcgccccg
ccgtccacgaccacgccccgagctgtgggaccgccccgcacatcctcaccggtgacctctcgggggacatggctcg
aacgccccctcgcccagggcctggccgcccacccgacagggccgacccatctcttccctggccgacggcaccatgg
acgcgccactgctcgccctacggcaccacacacatcgcgccgacagagaggctcgccgcccgtcaccgaggccctgc
gcgctcgtcaaggacggcgccacgtggctcctgcacgacttcgacgacgcccagccccatggcagcgttcttcaccg
acatcgctccacccccacaccacagccggccacgactaccgcccacttctcccgacacttctggccgaaactcttcg
ccgaggcgggcacaccggccccgctcgctcgacactgtacgacccactcgtagtcgcgggcaccaccgaggaggagg
cgcgccgcccgcacgtgctgacgtggccgacatgtacggagtcggcgcggttcttcgccaccctggcggaaccg
acgctgctggcgactcctggaggagtacttccagcagcagacacctacctgtcgaccctgcccagacagaccgact
tcaccaccgcccgcacgtcctacccgtccgagggcgcccttcacgcgcgagataccccgcgcgccatcgctcgccg
tctcccacaagccacccacctgaaagctttttttt3'

e) *ilvE* für die Klonierung im Vektor pCB28(a+)

5' aaaaaaggatccatgacgacgcccacgatcgagctcAAGCCCTCTGCCCCACCCGCTCTCGGACTCCGAGCGCG
CGGCGATTCTGGCCAACCCCGGGTTCGGCCGCCACTTCACCGACCACATGGTGACGATCAAGTGACCGAGGGCC
GCGGCTGGCAGACGGCCAGCTGGTGCCGTACGCCCCGCTCTCCCTCGACCCGGCCACCATGGTCTCCTGCACTACG
CGCAGGAGATCTTCGAGGGCCTGAAGGCCTACCGGCGGCCCCGACGGCTCCGTCGCCACCTTCCGCCCCGAGAAAG
ACGGCGCCCGCTTCCAGGCGTCTCGCGCCGCCTGGGCATGCCCCGAGCTTCCCGTGACACCTTCATCGAGGCCCT
GCGACGCGCTGGTTCGCGCAGGACGAGAAGTGGGTGCCGGCGCACGGCGGCGAGGAGTCCCTGTACCTGCGCCCCCT
TCATGATCGCGACCGAGGTTCGGCCTGGGCGTCAGGCCGGCCAACGAGTACCTCTTCATCGTCATCGCCTCCCCGG
CCGGCGCCTACTTCCCGGGCGGGGTCAAGCCGGTCTCCATCTGGGTCTCCGAGGACCGGTCCGCGCCGTCCCCG
GCGGCATGGGCGACGCCAAGACCGGCGGCAACTACGCGGCCTCCCTGCTCGCCCAGGCCGAGGCCGCCGCCAAGG
GCTGCGACCAAGTCTGCTACCTCGACGCCATCGAGCGCAAGTGGGTTCGAGGAACCTGGGCGGCATGAACCTGTACT
TCGTGTACGGCAACAAGATCGTCACGCCCTCCCTCACC GGCTCCATCCTGGAGGGCGTCAACCGCGACTCCCTGC
TCACCGTCGCCCCGACCTCGGTTACGAGGCCGAGGAGGGCCGCGTCTCGGTTCGACCAGTGGCAGCGCGACTCGG
AGAACGGCACCCCTCACCAGGTCTTCGCCTGCGGCACCGCGGCCGTGATCACCCCGTCGGCACGGTCAAGCGGG
CCGGCGCGCAGTGGCAGCAGAGCGGGGCGAGACGGGTGAGGTGACGCAGCGGTGCGGGACGCGCTGCTCGACA
TTCAGCGCGGGACGGTTCGCCGACCCGCACGggtggatgcacacgctggcctgaaagctttttttt3'

f) *cdapSIII-PCP10* für die Klonierung im Vektor pQTEV

5' aaaaaaggatcccggaaccgcgggcgcggaacacacgacacgctggcctgaaagctttttttt3'
AGGTCCTGTGCTGCCGGGCGTCACCGTCGACGACGACTTCTTCGACCTCGGCGGTCACTCCCTGCTCGCCACCC
GGCTCGTCAGCCGGGTCCGCACCACGCTGGGGCCGAGCTGTCCATCCGGCAGTTCTTCGAGGCGCCGACCCCG
CCGCGCTCGCCgtggtgctcgccggggcgcgccgctttttttt3'

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Mohamed A. Marahiel für die interessante Themenstellung und seine stete Ansprechbarkeit und Diskussionsfreude, sowie für die hervorragende Laborausstattung und die guten Arbeitsbedingungen. Dabei möchte ich besonders seine Offenheit für neue Vorschläge hervorheben, deren Finanzierung nie ein Problem war. Das ermöglichte es mir, verschiedenste Techniken selbst auszuprobieren und dadurch kennenzulernen. Auch für die Möglichkeit, meine Arbeit auf zwei internationalen NRPS/PKS-Konferenzen in Santa Cruz (USA) und im Kleinwalsertal (Österreich) präsentieren zu können, bin ich sehr dankbar.

Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen danke ich für hilfreiche Diskussionen und seine stete Ansprechbarkeit, sowie besonders für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Bei Herrn Prof. Dr. Eric Leif Meggers und Herrn Prof. Dr. Michael Bölker bedanke ich mich für ihre Bereitschaft, der Prüfungskommission anzugehören.

Dr. Jan Grünewald hat mich in der ersten Hälfte der Doktorarbeit durch ein wunderbares Teamwork unterstützt, wofür ich ihm herzlich danke.

Dieses Teamwork setzte sich später mit Florian Kopp fort, der mir in einer schwierigen Phase entscheidenden Zuspruch gab, um mein Projekt erfolgreich weiterzuführen, wofür ich ihm sehr dankbar bin. Dieser Dank gilt aber auch der weiteren Crew aus 4707, nämlich Verena Pohlmann und Matthias Strieker, die zusammen mit Florian für die „nice atmosphere“ gesorgt haben, die mich durch den Laboralltag getragen hat. Dadurch bin ich morgens oft gern zur Uni gegangen.

Entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit hat Antje Schäfer beigetragen, die mit unermüdlichem Eifer die Expression und Aufreinigung schwerlöslicher Methyltransferasen optimiert hat und dabei nie den Mut und die Geduld verloren hat. Für alle Hilfe, die Carola Kisselbach und Sebastian Friedrich dabei geleistet haben, bin ich ebenfalls sehr dankbar.

Das gleiche gilt auch für Dr. Uwe Linne, der immer Lösungsvorschläge für Fragen aller Art hatte, besonders was HPLC und Massenspektrometrie betrifft.

Katja Kräling hat mir durch eine Reihe von Peptidsynthesen die Arbeit sehr erleichtert. Ihre Zuverlässigkeit und ihr hervorragendes Organisationstalent machen die Arbeit mit ihr zur Freude.

Gabi Schimpff-Weiland und Christiane Bomm danke ich für all die abgenommene Arbeit. Das gilt auch für Roswitha Roller-Müller, die den AK 66 am Laufen hält und bei der man sich immer willkommen fühlt.

Beim restlichen Arbeitskreis, besonders bei Dr. Stephan A. Sieber, Dr. Björn Wagner und Dr. Nadine Schracke, bedanke ich mich für viele aufmunternde Worte, Tipps und Tricks und gute Ideen.

Dr. Jason Micklefield (Manchester Interdisciplinary Biocentre) und seinen Mitarbeitern danke ich herzlich für die Bereitstellung von synthetischem 3-MeGlu und die Hilfe bei der Konfigurationsbestimmung des 3-MeGlu.

Für ihre engagierte Hilfe danke ich auch sehr herzlich meinen Vertiefungsstudenten Anita Jansen, Detlef Eppers, Verena Pohlmann, Martin Stieler und Jessica Fischer.

Verena Pohlmann, Florian Kopp und Dr. Uwe Linne danke ich für die gründliche Korrekturlesung dieser Arbeit.

Bei Dr. Wilfried Hess bedanke ich mich herzlich für all seine Hilfe bei organischen Synthesen.

Besonders dankbar bin ich meinem Bruder Michael für viele schöne Stunden und viele Ratschläge und auch meinen Brüdern Kilian und Felix für aufmunternde Worte und ihr Zuhören, wenn es mal schwierig wurde.

Meiner Freundin Anna danke ich für die vielen schönen Abende in der Fichtestraße und später die wundervollen Wochenenden in Dresden und Marburg. Dadurch konnte ich die Arbeit immer wieder völlig vergessen und neue Kraft sammeln.

Mein größter Dank gebührt meinen Eltern für die große Unterstützung während meines ganzen Studiums und die vielen schönen Abende und Sonntage in Ockershausen und Schönstadt. Ohne diese Hilfe wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen.